



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN EFECTORA DE
MACRÓFAGOS POR miR-223 Y DE LINFOCITOS T
CD8⁺ POR PD-1**

Jesús Ogando Castro

Licenciado en Bioquímica

Para optar al grado de doctor en Biociencias Moleculares

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

Madrid, 2018

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección del Dr. Santos Mañes Brotón y la Dra. Rosa Ana Lacalle Blanco.

Jesús Ogando Castro ha sido beneficiario de una beca FPI (FPI BES-2012-059976) concedida por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

**Menos cabeza,
más corazón.**

Valentí San Juan

RESUMEN

La respuesta coordinada del sistema inmune es fundamental para defendernos de agentes externos, pero deben existir mecanismos que regulen la tolerancia a antígenos propios. El desbalance en estos mecanismos homeostáticos conduce a la autoinmunidad, o a la incapacidad de respuesta del sistema inmune para protegernos frente a algunas patologías como el cáncer. En esta tesis hemos analizado dos procesos moleculares que condicionan la actividad de los macrófagos (MΦ), como parte del sistema inmune innato, y de los linfocitos CD8⁺ citotóxicos, un tipo de célula efectora del sistema inmune adaptativo.

Hemos identificado que los MΦ sinoviales de los pacientes de artritis reumatoide (AR) sobreexpresan el microRNA 223 (miR-223), comparado con los MΦ sinoviales aislados de pacientes con osteoartritis, una enfermedad inflamatoria no autoinmune. El aumento del miR-223 correlacionó con la menor expresión de Notch3 y sus genes diana en los pacientes de AR. Demostramos que la activación de la vía de Notch disminuye los niveles del miR-223 en los MΦ. También hemos identificado una diana del miR-223, el traslocador nuclear del *aryl hydrocarbon receptor* (AhR), ARNT (o HIF-1β). La sobreexpresión del pre-miR-223 disminuyó los niveles de la proteína de ARNT mediante su unión a la región 3'-UTR. Los niveles de ARNT y CYP1B1, un gen diana de la vía del AhR, fueron menores en el tejido sinovial de AR comparado con los de OA. Los altos niveles del miR-223 también impidieron la reducción de citoquinas proinflamatorias inducida por la vía del AhR en los MΦ. Nuestros resultados asocian el aumento de los niveles del miR-223 en los MΦ de pacientes de AR con la disminución de la señalización de Notch e identifican al miR-223 como un regulador negativo de la vía del AhR a través de la disminución de ARNT.

En este trabajo también hemos comparado la activación de linfocitos humanos CD8⁺ con la señalización de un regulador negativo de sus funciones citotóxicas, como es el receptor *programed cell death protein 1* (PD-1), determinando que se produce un bloqueo en el aumento de la expresión de genes mitocondriales, afectando negativamente al número de mitocondrias y a su actividad. También las crestas de las mitocondrias se mantuvieron desorganizadas cuando se activa el PD-1, correlacionado con el bloqueo del aumento de expresión de las proteínas que forman los complejos MICOS, los cuales anclan las crestas mitocondriales a las membranas. Contrariamente a las CD8⁺ activadas, el PD-1 reprimió el cambio del metabolismo mitocondrial y a la ruta glucolítica. La sobreexpresión de proteínas individuales que forman parte del complejo MICOS (sitios de contacto y organización de crestas mitocondriales) no tuvo efectos sobre la funcionalidad de las mitocondrias ni sobre la activación de las CD8⁺. Nuestros resultados asocian la señalización del PD-1 con defectos en el cambio de las mitocondrias que sí se producen en la activación de las CD8⁺, afectando a su metabolismo e impidiendo la respuesta al antígeno.

ABSTRACT

A coordinated response by the immune system is essential to defend us against external agents, but other mechanisms are needed to regulate tolerance to our own antigens. Deregulation of these homeostatic mechanisms leads to autoimmunity or to an inefficient immune response to pathologies such as cancer. In this thesis, we analysed two molecular processes that modulate the activity of macrophages (MΦ) as a part of the innate immune system, and of CD8⁺ lymphocytes as a type of effector cell of the adaptive immune system.

We found that synovial macrophages from rheumatoid arthritis (RA) patients overexpressed microRNA 223 (miR-223) when compared to synovial MΦ isolated from patients with osteoarthritis (OA), a non-autoimmune inflammatory disease. miR-223 upregulation correlated with reduced Notch3 and Notch effector expression in RA patients. Activation of the Notch pathway in monocytes and MΦ led to Notch-mediated downregulation of miR-223. We also identified a miR-223 target, the aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator (ARNT or HIF-1β). Pre-miR-223 overexpression reduced ARNT protein levels by binding to its 3'-UTR region. Levels of ARNT and of CYP1B1 (a gene induced by AHR/ARNT signalling) were lower in RA synovial tissue compared to OA tissues. The AhR-mediated reduction in pro-inflammatory cytokines was impaired by miR-223 in MΦ. Our results associate miR-223 upregulation in RA macrophages with a decrease in Notch signalling, and identify miR-223 as a negative regulator of the AhR pathway via ARNT targeting.

In this study, we also compared the activation of human CD8⁺ lymphocytes to the pathway of a negative regulator of cytotoxic CD8⁺ T cell function, the inhibitory programmed cell death protein 1 (PD-1). We determined that PD-1 engagement blocked the enhanced expression of mitochondrial genes, which affected mitochondrial number and activity. PD-1 also maintained disorganization of mitochondrial cristae, and blocked increased expression of proteins that form the MICOS complexes (mitochondrial contact site and cristae organizing system), which anchor cristae to mitochondrial membranes. At difference from the activated CD8⁺ T cell, PD-1 suppressed the switching of mitochondrial metabolism and the glycolytic route. Overexpression of some individual proteins that form part of MICOS complex had no effect on mitochondrial function or CD8⁺ T cell activation. Our results associate PD-1 signalling to defects in mitochondrial switching after CD8⁺ T cell activation, which affects their metabolism and prevents a response to antigen.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. El sistema inmune	7
1.1 Respuesta inmune innata y adaptativa	7
1.2 Tolerancia central y periférica	9
1.2.1 Puntos de control del sistema inmune adaptativo (<i>immunecheckpoints</i>)	10
1.2.2 Pérdida o ganancia de tolerancia periférica	11
1.2.3 microRNA como reguladores del sistema inmune	12
2. Patologías articulares: la artritis reumatoide y la osteoartritis	13
2.1 Implicación de los macrófagos en la respuesta autoinmune asociada a AR	15
2.2 microRNAs en AR	15
2.2.1 miR-223	16
2.3 La vía de señalización de Notch	16
2.4 La vía del AhR/ARNT	18
3. Regulación de la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T	20
3.1 Activación de los linfocitos T por antígeno	20
3.2 La vía PD-1/PD-L1	21
3.3 El metabolismo en la activación y diferenciación de las células T	23
3.3.1 La vía PD-L1 y el metabolismo celular	25
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Muestras de pacientes o donantes humanos	33
2. Extracción de ARN y de ADN	33
3. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	34
4. miRNA array y RNA-seq	37
5. Análisis informáticos	38
5.1 Identificación de las dianas del miR-223	38
5.2 Análisis GSEA	39
5.3 Agrupación por categorías de genes diferencialmente expresados	39
6. Cultivo celular	40
7. Transfección de células HEK-293T y ensayos luciferasa	41
8. Cocultivo de monocitos con células OP-9	41
9. Transfección y estimulación de células THP-1	41
10. Estimulación de linfocitos T y monocitos humanos	42
11. Ensayos de proliferación celular	42
12. Transducción de células hCD8⁺	42
13. Inmuno-ensayos	43
13.1 Inmunoblot	43
13.2 Citometría de flujo	44
13.3 Determinación de masa y potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	45
13.4 Tinción de células por inmunofluorescencia	45
13.5 Inmunohistoquímica de tejido sinovial	46

14. Microscopía electrónica de barrido.....	47
14.1 Cuantificación de estructuras mitocondriales.	47
15. Ensayos metabólicos.	48
15.1 Determinación de respiración mitocondrial y glucólisis.	48
15.2 Determinación de lactato.	49
16. Análisis estadístico.....	49
17. Nomenclatura.	50
<u>RESULTADOS</u>	<u>53</u>
1. Desregulación de la función de macrófagos sinoviales en artritis reumatoide por el miR-223.	53
1.1 Los macrófagos de pacientes con artritis reumatoide expresan un perfil de miRNAs específico.....	53
1.2 Los niveles del miR-223 no están regulados por citoquinas proinflamatorias.	54
1.3 La vía de señalización de Notch es menos funcional en pacientes con AR.....	56
1.4 La vía de señalización de Notch regula la expresión del miR-223	59
1.5 Búsqueda de dianas del miR-223.....	60
1.6 miR-223 regula la traducción de la proteína ARNT.	63
1.7 miR-223 aumenta la producción de citoquinas inhibiendo la vía del AhR.	63
1.8 Atenuación de la vía del AHR en el tejido sinovial de pacientes de AR.	65
1.9 miR-223 regula los niveles de Notch vía AhR/ARNT.....	68
2. Análisis de las señales inducidas por PD-1 en linfocitos T CD8 humanos.....	70
2.1 Generación de un modelo <i>ex vivo</i> de señalización mediada por PD-1.	70
2.2 Análisis de la expresión diferencial de microRNAs y mRNA mediada por PD-1 en linfocitos hCD8 ⁺	71
2.2.1 La señalización del PD-1 no provoca cambios específicos en la expresión de miRNAs.	73
2.2.2 La señalización del PD-1 provoca cambios específicos en la expresión de mRNAs.....	74
2.2.3 Validación de los resultados de RNA-seq por RT-qPCR.	77
2.3 La vía PD-1/PD-L1 regula la función mitocondrial.....	80
2.3.1 La vía PD-L1/PD-1 afecta la expresión de genes de metabolismo celular.	80
2.3.2 La vía PD-1/PD-L1 bloquea la expresión de genes mitocondriales.....	81
2.3.3 La vía PD-1/PD-L1 bloquea el aumento de la masa mitocondrial.	84
2.3.4 La vía PD-1/PD-L1 limita el número y longitud de las crestas mitocondriales..	86
2.3.5 La vía PD-1/PD-L1 restringe la respiración celular.	89
2.3.6 La vía PD-1/PD-L1 limita el uso de la glicólisis.	90
2.3.7 La sobreexpresión de proteínas individuales del complejo MICOS no rescata el efecto de PD-1 sobre la polarización mitocondrial.	91
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>97</u>
1. La desregulación del eje Notch / miR-223 / AhR en macrófagos de AR.....	97
2. Mecanismos de inmunosupresión mediados por PD-1 en linfocitos T CD8.....	102
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>111</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>115</u>
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>137</u>

ABREVIATURAS

3'-UTR	Región 3' del mRNA no traducida
³ H-TdR	Timidina tritiada
3MC	3-metilcolantreno
aAPCs	Células presentadoras de antígeno artificiales
Aco-2	Aconitasa 2
ACPA	Anticuerpos anticitrulina
ACT	Esferas revestidas de anti-CD3 y anti-CD28
ACT+PD-L1	Esferas revestidas de anti-CD3, anti-CD28 y PD-L1
AGO	Proteínas de la familia Argonauta
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> (Receptor de hidrocarburos de arilos)
AhRR	Represor del AhR
AIP	<i>AhR interacting protein</i> (Proteína de interacción de AhR)
APCs	Células presentadoras de antígeno
AR	Artritis Reumatoide
ARNT	<i>AhR nuclear translocator</i> (Translocador nuclear del AhR)
ATCC	<i>American type culture collection</i> (Colección americana de cultivos tipo)
BaP	Benzo[a]pireno
BINGO	<i>Biological network gene ontology tool</i> (Herramienta de redes biológicas de GO)
BMMC	Células mononucleares derivadas de médula ósea
CIA	Modelo de AR inducida por vacunación con colágeno
CTE	Cadena de transporte de electrones
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CYP	Familia de proteínas del citocromo P450
DAG	Diacylglicerol
DAPT	Inhibidor de la gamma-secretasa
DC	Célula dendrítica
DISC	Complejo inducible de señal de muerte
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNP	2,4-dinitrofenol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
EAE	Encefalomiелitis
ECAR	Tasa de la acidificación del medio
EGR1	<i>Early growth response 1</i> (Respuesta temprana a crecimiento)
FAO	Oxidación de ácidos grasos

ABREVIATURAS

FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FDR	<i>False discovery rate</i> (Tasa de falso descubrimiento)
FICZ	6-Formil Indol(3,2-b)carbazol
FR	Factor reumatoide
FT	Factor de transcripción
GO	<i>Gene ontology consrotium</i> (Consortio de ontología de genes)
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i> (Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes)
hCD8	Linfocitos T humanos CD8
HES	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HEY	<i>Hairy and enhancer of split YRPW motif</i>
HIF	Factor inducible por hipoxia
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen – antigen D related</i> (Antígeno leucocitario humano-antígeno D)
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i> (Proteína de choque térmico 90)
ICZ	Indol(3,2-b)carbazol
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IKK α	Quinasa inhibidora del factor nuclear kappa-B subunidad alpha
IL	Interleuquina
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i> (Quinasa ligada a integrinas)
IP	Ioduro de propidio
IP3	Inositol1,4,5-trifosfato
IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i> (Análisis de vías por ingenuity)
ISO	Anticuerpo control de isotipo
ITAM	Dominios intracelulares <i>immunoreceptor con motivos de activación basados en tirosina</i>
ITE	Ester metílico del ácido 2-(1Hindol-3-ilcarbonil)-4-tiazolcarboxílico
ITIM	Dominios intracitoplásmicos tipo <i>immunoreceptor con motivos inhibidores basados en tirosina</i>
iT _{REG}	Células T reguladoras inducidas
ITSM	Dominios intracitoplásmicos tipo inmunoreceptor con motivos conmutadores basados en tirosina
Kyn	Kinurenina

LRT	<i>Likelihood ratio test</i> (Test de tasa de probabilidad)
ME	Microscopía electrónica
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> (Intensidad media de fluorescencia)
MIB	Complejos de unión de espacio intermembrana mitocondrial
MICOS	Sitio de contacto mitocondriales y sistemas de organización de crestas
miRNA	Micro ARN
MΦ	Macrófago
MOI	Multiplicidad de infección
mROS	Especies reactivas de oxígeno mitocondriales
MSigDB	<i>Molecular signatures database</i> (Base de datos de firmas moleculares)
MTG	<i>Mitotracker Green FM</i> (Marcador de mitocondrias verde)
MTOC	Centro organizador de microtubulos
n.d	No detectado
NET	Trampa extracelular de los neutrófilos
NICD	Parte intracelular del receptor Notch
NK	Célula asesina natural
nT _{REG}	Células Treg naturales
OA	Osteoartritis
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PAD	Enzima peptidil arginina deaminasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCA	Análisis de componentes principales
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i> (Proteína de muerte celular programada-1)
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i> (Ligando 1 de PD-1)
PD-L2	<i>Programmed cell death-ligand 2</i> (Ligando 2 de PD-1)
PDCD1	Gen del PD-1
PFA	Paraformaldehído
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKCθ	Proteína quinasa C-θ
pri-miRNA	Estructuras imperfectas de doble hebra tipo lazo
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrón
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RISC	Complejo ribonucleoproteico de silenciamiento inducido por ARN
RMA	<i>Robust multi-array average</i>
RNA-seq	Secuenciación masiva de ARN

ABREVIATURAS

RQ	Cantidad relativa
RXR	<i>Retinoid X receptor</i> (Receptor X retinoide)
SEM	Error estándar de la media
sPD-1	Forma Soluble del PD-1
SRC	Capacidad respiratoria mitocondrial adicional o de reserva
SRF	Factor de respuesta a suero
STEM	<i>Short time-series Expression Miner</i> (Series de expresión de tiempos cortos)
T-ALL	Células de leucemia linfoblástica aguda de células T
TA	Temperatura ambiente
TAD	Dominio transactivador
TAF1	Factor asociado a la unión de la caja TATA
TC	Tasa de cambio o veces de inducción
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TCR	Receptor de linfocitos T
TECs	Células epiteliales corticales del timo
T _H	Células T <i>helper</i> (cooperadoras)
TILs	CTLs infiltradoras de tumores
TLRs	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor tipo <i>Toll</i>)
T _{MEM}	Células T de memoria
TMRM	Éster metílico tetrametilrodamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
T _{REG}	Células T reguladoras
XREs	Elementos de respuesta a xenobióticos
$\Delta\Psi_m$	Gradiente de potencial de membrana mitocondrial

INTRODUCCIÓN

1. El sistema inmune.

La idea del sistema inmune como un conjunto de estructuras y procesos biológicos para defender al organismo no surge hasta 1965, con los estudios de Cooper y Good¹. Hasta entonces, se hablaba únicamente de *inmunidad* en componentes separados: inmunidad humoral y celular². En los últimos 50 años se ha estudiado el sistema inmune como un complejo sistema totalmente interconectado diferenciándose entre inmunidad innata y adquirida³. Los macrófagos (MΦ), neutrófilos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC), mastocitos, eosinófilos, basófilos y el sistema del complemento pertenecen a la respuesta innata y actúan como primera línea de defensa frente a patógenos y antígenos extraños. Los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ y los linfocitos B, dirigen su respuesta contra antígenos que son presentados por las células presentadoras de antígenos (APCs) a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y conforman la respuesta adquirida o adaptativa⁴.

El sistema ha evolucionado hasta alcanzar un repertorio de reconocimiento de antígenos que es muy superior al número de antígenos que se pueda generar de manera natural en cada individuo. Entre los antígenos reconocidos están incluidos los del propio organismo, de tal manera que se tiene que generar autotolerancia para distinguir antígenos propios de extraños. Para evitar las enfermedades autoreactivas existen puntos de control que eliminan, bloquean o reducen la respuesta contra antígenos propios. Cuando estos procesos de regulación inmune no son eficaces, aparecen las enfermedades autoinmunes que destruyen tejidos sanos.

El sistema inmune también se ha mostrado capaz de reaccionar frente al cáncer, siendo éste el conjunto de enfermedades que implican el crecimiento y la propagación sin control de células neoplásicas. Las células cancerígenas expresan antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por el sistema inmune y así, ser atacadas y destruidas. Sin embargo los tumores evitan, por mecanismos variados, la acción antitumoral del sistema inmune. El bloqueo de los puntos de control inmune o *immunecheckpoints*, como PD-1 o CTLA-4, con anticuerpos neutralizantes se ha convertido en uno de las terapias más prometedoras para el tratamiento de tumores sólidos; estos anticuerpos reactivan la respuesta inmune antitumoral al evitar uno de los mecanismos inmunosupresores inducidos por las células neoplásicas⁵.

1.1 Respuesta inmune innata y adaptativa.

La respuesta innata ocurre en las primeras horas o días de exposición frente a potenciales patógenos y xenoantígenos. Conservado entre vertebrados e invertebrados, no se trata de un reconocimiento específico de antígeno, sino de patrones moleculares

asociados a patógenos (PAMPs) mediante receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), y que no se encuentran en el organismo anfitrión. El sistema del complemento y los receptores *Toll-like* (TLRs) son capaces de reconocer a los PAMPs, desencadenando una respuesta inflamatoria y fagocitaria.

Los MΦ se diferencian a partir de monocitos periféricos y residen en los tejidos donde fagocitan lo que es reconocido como ajeno al individuo, células apoptóticas o restos celulares. Son capaces de reconocer los elementos externos mediante los TLR y los receptores para la región Fc de los anticuerpos, o reaccionar frente al sistema del complemento activo⁶. Clásicamente se los ha clasificado en dos subtipos: M1 o inflamatorios y M2 o antiinflamatorios; aunque recientemente se tienden a nombrar según la fuente de los macrófagos, los activadores y los marcadores consenso⁷. Además de su función fagocítica, los MΦ actúan como sistema de alarma reclutando, mediante la producción de moléculas proinflamatorias, a otros tipos celulares del sistema inmune innato y adaptativo para amplificar la respuesta.

La respuesta inmune adaptativa es capaz de reconocer a los antígenos de manera muy específica. Los linfocitos B son los implicados en la respuesta humoral; generan anticuerpos o inmunoglobulinas que se unen específicamente a antígenos localizados en la sangre o en fluidos corporales que previamente han estimulado su producción. De esta manera pueden bloquear la interacción patógeno-hospedador y activar la respuesta de las células fagocíticas del sistema inmune innato al formar complejos inmunes antígeno-anticuerpo⁸.

La respuesta adaptativa celular está mediada por linfocitos T que reaccionan frente a un antígeno específico. Aunque existen subtipos minoritarios, como las células NKT⁹ y las células Tγδ¹⁰, las células T tras madurar en el timo se clasifican en dos grandes subgrupos según la expresión de un receptor de membrana: CD4⁺ o CD8⁺. La activación de células T y su diferenciación requieren de la unión del receptor de células T (TCR) a un antígeno específico, presentado en complejo con el MHC por las APC (MHC tipo I para la activación de las células CD8⁺ y MHC tipo II para las células CD4⁺), de una señal coestimuladora y de la estimulación con citoquinas específicas. Las señales de coestimulación son esenciales para evitar la anergia y la apoptosis¹¹ y permitir la proliferación y secreción de citoquinas¹². Ciertos estudios sugieren que la coestimulación no es necesaria en células CD8⁺¹³. Dependiendo de las señales recibidas, los linfocitos T se diferencian a células efectoras (células T *helper* (T_H) en las CD4⁺, y células T citotóxicas (CTL) en las CD8⁺), a células T reguladoras (T_{REG}) y a células T de memoria (T_{MEM}). Las CD4⁺ T_H, nombradas así por cooperar con células T CD8⁺, macrófagos o células B, potencian la respuesta inmune y están implicadas en ocasiones con

enfermedades autoinmunes^{14,15}; las más importantes dentro de este subtipo proinflamatorio son las T_H1 , T_H2 y T_H17 . Las células T_H1 secretan $IFN\gamma$ y potencian la respuesta inmune de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, macrófagos y células B; las células T_H2 producen IL-4, -5, -10, -13, y potencian la acción de eosinófilos, basófilos, mastocitos, células B y células $CD4^+$; finalmente, las células T_H17 , controlan la respuesta de células B frente a patógenos en mucosas mediante la producción de IL-17. Por el contrario, el subtipo de células $CD4^+$ T_{REG} inhiben al sistema de defensa para mantener la homeostasis inmune. Las T_{REG} “naturales” (nT_{REG}) se generan en el timo y las iT_{REG} (inducidas) se generan fuera del timo a partir de células T *naïve* por determinados estímulos inflamatorios^{16,17}.

Los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos son los ejecutores de la respuesta celular. Ejercen la citotoxicidad por liberación de citoquinas solubles y/o por lisis directa de la célula diana. Existe un mecanismo de acción rápida que utiliza rutas exocíticas de degranulación citotóxicas con perforinas, granzimas y granulolisinas, moléculas que se liberan en el punto de contacto con la célula diana para generar poros en la membrana, y permitir la entrada de proteasas que activarán el sistema de caspasas y la apoptosis celular¹⁸. Otro mecanismo de actuación involucra al receptor de membrana FAS expresado en las células diana, y a su ligando FasL expresado en las células $CD8^+$. Este sistema induce la apoptosis a través del complejo inducible de señal de muerte (DISC) activando la caspasa-8¹⁹. La liberación de factores solubles de inhibición del crecimiento como el factor de necrosis tumoral (TNF) α y el interferón (IFN) γ , es un mecanismo alternativo por el que las $CD8^+$ controlan el crecimiento celular²⁰.

La habilidad del sistema adaptativo de recordar las respuestas pasadas está mediada por las células T $CD8^+$ y $CD4^+$ de memoria, permitiendo una respuesta rápida y protegiendo de forma efectiva frente a infecciones²¹.

1.2 Tolerancia central y periférica.

El mantenimiento de la homeostasis inmune es crucial para la supervivencia del organismo. Reaccionar de manera incontrolada frente a patógenos o frente a antígenos propios puede provocar daños en los tejidos sanos y enfermedades autoinmunes. La tolerancia a ‘lo propio’ se mantiene por eliminación clonal durante el desarrollo de linfocitos T y B en el timo y en la médula ósea respectivamente (tolerancia central), y por supresión o inactivación de linfocitos T y B maduros en tejidos u órganos linfoides secundarios (tolerancia periférica).

La maduración de los linfocitos T ocurre en el timo. En la primera etapa se seleccionan los precursores de células T (timocitos) que pueden generar una respuesta inmune adecuada. Así los timocitos dobles positivos $CD4^+$ y $CD8^+$ interactúan con células epiteliales corticales del timo (TECs) para unirse a MHC-I o MHC-II. En función de la afinidad de la interacción, los timocitos se eliminarán por ausencia de estímulo o por una unión demasiado fuerte. En una unión de fuerza intermedia se situarán las células $CD4$ o $CD8$ viables y las T_{REG} (selección positiva). En un siguiente estadio los timocitos dobles positivos pasarán a ser solamente $CD4$ o $CD8$. La siguiente etapa es la selección negativa, en la que las TECs medulares y DC presentan antígenos del propio organismo a las células T, de tal manera que no sobrevivirán las que reaccionan frente a antígenos propios. Sin embargo existe un grupo de autoantígenos que no inducen la eliminación clonal en el timo, bien porque no son suficientemente abundantes o bien porque no se expresan en ese órgano, como ocurre con antígenos de tejidos inmunoprivilegiados²².

La tolerancia periférica evita que se produzcan reacciones autoinmunes debido a escapes de células T que reconocen antígenos propios del individuo y supone un mecanismo adicional de control que disminuye la actuación de las células T. Se establece por varios mecanismos. Los antígenos pueden ser ignorados al ser expresados en bajas cantidades o no ser detectados por encontrarse en órganos inmunoprivilegiados, que cuentan con barreras físicas y que expresan citoquinas antiinflamatorias o Fas-L, un inductor de apoptosis en las células T. Antígenos en bajas cantidades pueden generar una presentación sin coestimulación, propiciando un estado sin respuesta o anergia en células T. Las DC tolerogénicas también consiguen suprimir la respuesta inmune al eliminar células T o inducir T_{REG} , (nT_{REG} y las iT_{REG}). Otro tipo de regulación periférica está mediada por los *immunecheckpoints*, que regulan negativamente la respuesta inmune en tejidos periféricos²³⁻²⁵.

1.2.1 Puntos de control de la activación del sistema inmune adaptativo (*immunecheckpoints*).

Los *immunecheckpoints* son receptores presentes en las células T que permiten o impiden su activación. Tras la ligación entre el complejo MHC-antígeno y el TCR del linfocito, es necesaria una segunda señal de tipo coestimuladora o coinhibidora para regular la funcionalidad de los linfocitos T. La expresión de señales inhibitorias, tanto en las APC como en las células diana, reprimen la actividad efectora. Tienen su utilidad para mantener la tolerancia y modular la duración e intensidad de la respuesta inmune, minimizando el daño colateral. Se han descrito numerosas moléculas inhibitoras y activadoras con funciones no redundantes entre ellas (Fig. 1), lo que las convierte en elementos con gran capacidad de regulación específica. A lo largo de este trabajo nos

centraremos y analizaremos en profundidad la ruta coinhibidora mediada por el receptor PD-1.

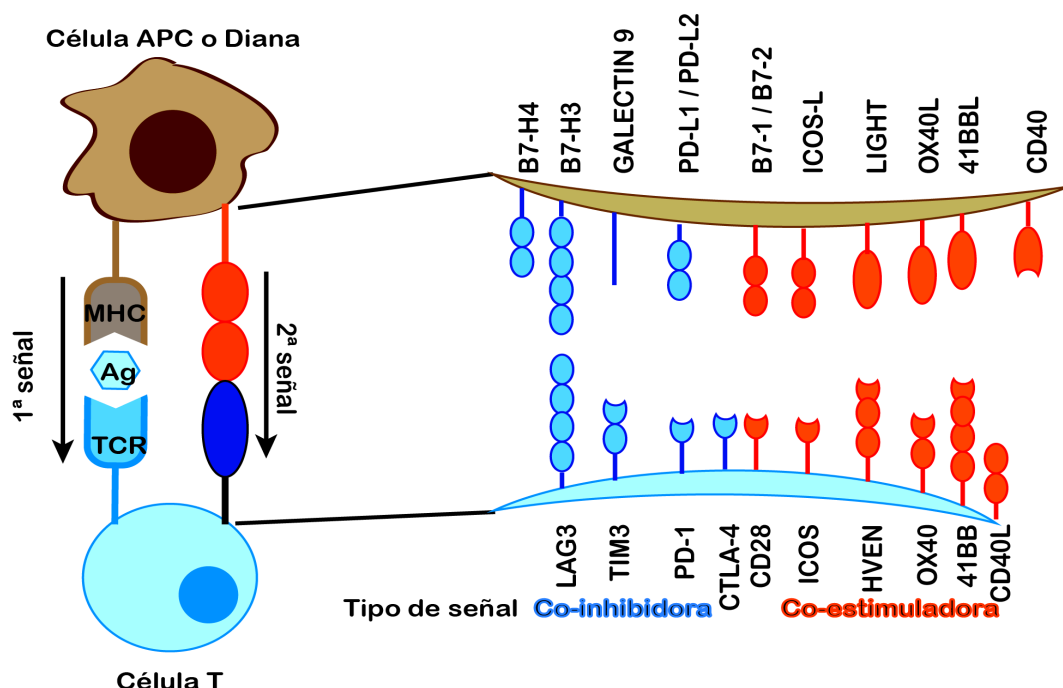


Fig. 1. Puntos de control inmune o *immunecheckpoints* que regulan positiva o negativamente las respuestas inmunes. Adaptado de²⁶.

1.2.2 Pérdida o ganancia de tolerancia periférica.

La pérdida de la tolerancia periférica tiene como consecuencia el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Puede ocurrir por cambios en el entorno celular producido por diversas infecciones y/o por factores genéticos. Ciertos antígenos infecciosos pueden causar reacciones autoinmunes al ser miméticos de antígenos propios. Las infecciones también pueden producir un tipo de muerte celular con la que se exponen autoantígenos en presencia de señales coestimuladoras reconocidos por las células APC, mientras que en condiciones de muerte celular programada, o apoptosis, no se produce esta presentación antigénica. Otros agentes que causen daño o modifiquen moléculas propias pueden originar reacciones autoinmunes. Factores epigenéticos, polimorfismos genéticos y factores hormonales que están involucrados en la producción de citoquinas proinflamatorias, presentación antigénica, eliminación de restos celulares y formación de complejos inmunes, también se han asociado a enfermedades autoinmunes^{27,28}.

Lo opuesto a la pérdida de tolerancia es una tolerancia excesiva; en determinadas situaciones los *immunecheckpoints* actúan impidiendo la respuesta efectora de las células T. Esta situación puede ocurrir en células tumorales al expresar los ligandos de los *immunecheckpoints*²⁹. Adicionalmente, en infecciones virales crónicas y cáncer, las

células T son estimuladas constantemente por el antígeno. Una activación persistente en el tiempo aumenta la tolerancia al aumentar la expresión de receptores inhibitorios y llevar a las células T un estado particular de anergia denominado estado celular exhausto, en el que disminuye la efectividad de la respuesta.

1.2.3 microRNA como reguladores del sistema inmune.

Los microRNAs (miRNAs) maduros son moléculas de ARN no codificante de ~19-25 nucleótidos, que regulan la expresión génica al ser complementarios parcialmente a secuencias de ARN mensajero (mRNA). Los miRNAs se sintetizan en el núcleo por la ARN polimerasa II o III, formando precursores largos con estructuras imperfectas de doble hebra tipo lazo (pri-miRNA). Éste se procesa por las enzimas *Drosha* y *DGCR8* para formar el pre-miRNA, el cual sale al citoplasma mediante la acción de la proteína *Exportin-5* y el complejo *Ran-GTPasa*. En el citoplasma el complejo *Dicer* corta y escinde el pre-miRNA en dos hebras, que forman un complejo ribonucleoproteico de silenciamiento inducido por ARN (RISC) con proteínas de la familia Argonauta (AGO). De 6 a 8 nucleótidos de la región 5' de este miRNA maduro (región semilla) se asocian a la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA diana. La formación del complejo, logra disminuir la traducción del mRNA bien por la degradación del mRNA, bien por la ineficiente elongación del ribosoma o bien por el corte del mRNA en dos fragmentos (Fig. 2). Un miRNA o varios miRNAs diferentes pueden actuar sobre múltiples mRNAs de una misma ruta para su modulación, pudiendo ser específicos de tejidos o situaciones concretas. Se les atribuyen regulaciones finas en la señalización, dando lugar en ocasiones a modulaciones incoherentes; por ejemplo, un factor de transcripción (FT) puede aumentar la expresión de un mRNA y al mismo tiempo del miRNA que reprime a ese mRNA³⁰. Descubiertos en 1993, y revelada su función en 2001³¹, los miRNAs son reguladores “jóvenes” a los que se les ha ido atribuyendo funciones adicionales a la del silenciamiento; por ejemplo, se ha descrito cómo los miRNAs también pueden inducir la expresión de proteínas³² y la existencia de *IsomiRs* o variantes de su secuencia consenso³³.

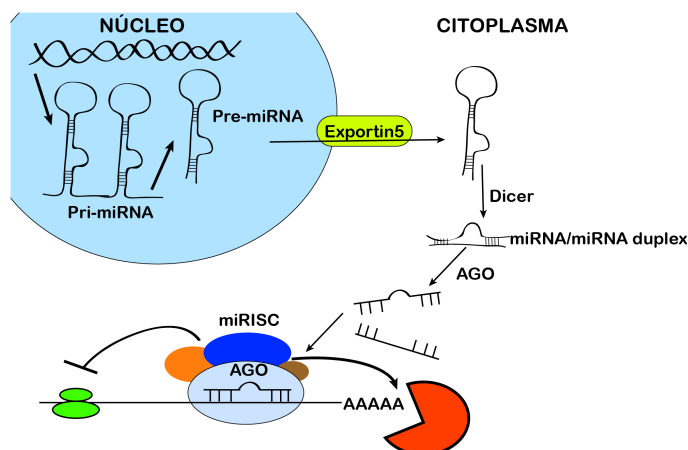


Fig. 2. Resumen del mecanismo de procesamiento y actuación de los miRNAs.

Las células del sistema inmune han de ser muy plásticas para generar todos los subtipos celulares a partir de las células madre hematopoyéticas. La eliminación de determinados miRNAs en modelos animales ha puesto de manifiesto la gran regulación de la tolerancia periférica que generan los miRNAs sobre el sistema inmune. El destino celular no es sólo determinado por factores de transcripción, sino que está muy influenciado por la expresión de miRNAs. Por ejemplo, el miR-155 está implicado en la generación de macrófagos, el miR-181 en las NK, el miR-181a en la generación de células B o el miR-150 en la generación de timocitos dobles positivos³³. Estos miRNAs logran mantener a las proteínas reguladoras en un rango de concentración estrecho que determina la diferenciación celular. Los procesos inflamatorios también se ven influidos por la desregulación de miRNAs, así como cánceres sanguíneos y enfermedades autoinmunes^{34,35}.

2. Patologías articulares: la artritis reumatoide y la osteoartritis.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica que afecta a las articulaciones, caracterizada por la inflamación y la destrucción de las mismas³⁶. Tiene una incidencia de entre un 0,5 y un 1% en la población mundial y afecta más las mujeres. Aunque de etiología desconocida y multifactorial, varía su prevalencia según factores genéticos asociados a poblaciones y polimorfismos concretos, factores ambientales y hormonales³⁷.

El 50-70% de los pacientes con artritis reumatoide poseen autoanticuerpos frente a sus propias inmunoglobulinas (Factor Reumatoide, FR) y/o anticuerpos anticitrulina (ACPA)³⁸. El FR son autoanticuerpos de isotipo IgM frente a la región Fc de las IgG, y su producción está influenciada por infecciones bacterianas y virales³⁹. La citrulina se forma a partir de arginina en una reacción catalizada por la enzima peptidil arginina deaminasa (PAD). Este cambio aminoacídico no natural se genera como consecuencia del humo del tabaco en pulmones o por infecciones bacterianas bucales. Los péptidos que contienen citrulina presentan una gran afinidad por el receptor *Human Leukocyte Antigen – antigen D Related* (HLA-DR), receptor del MHC-II presente en macrófagos, células B, células dendríticas y linfocitos T. Los polimorfismos HLA-DR1 y HLA-DR4 presentan mayor afinidad por estos péptidos, haciendo que los individuos que los expresan tengan mayor incidencia de AR⁴⁰. En la membrana sinovial de pacientes de AR se pueden encontrar proteínas citrulinadas (vimentina, α -enolasa, fibronectina, fibrinógeno, histonas y colágeno tipo II), que no existen en los tejidos sanos⁴¹, pero que se generan debido a la activación de PADs de la membrana sinovial tras la inflamación causada por lesiones mecánicas, traumáticas o infecciosas⁴².

Una articulación sinovial sana está compuesta por dos terminaciones óseas adyacentes recubiertas de cartílago, separadas entre sí por líquido sinovial y rodeadas por la membrana sinovial. Esta membrana consta de la capa íntima, formada por *sinoviocitos* de dos tipos: macrófagos (tipo A) y fibroblastos (tipo B), y otra capa sub-íntima con fibroblastos, macrófagos, tejido adiposo, vasos sanguíneos y células T y B en pequeñas proporciones⁴³. En las etapas iniciales de la AR, las células B generan los autoanticuerpos FR y/o ACPA inducidos por los MΦ y DC. Estos autoanticuerpos se acumulan en las articulaciones, activando respuestas inmunes, y produciendo inflamación de la membrana sinovial que cursa con una hiperplasia de la capa íntima con mayor proliferación de los macrófagos tipo-A. También aumentan las poblaciones inmunes en la capa sub-íntima, reclutándose más MΦ, DC, células T, células B, mastocitos y aumenta la angiogénesis^{38,44}. Desde la capa sub-íntima migran al líquido sinovial MΦ, neutrófilos y otros componentes del sistema inmune^{45,46} (Fig. 3). La extracción de líquido sinovial o artrocentesis es utilizada para aliviar el dolor a los pacientes y para diagnosticar la patología.

La osteoartritis (OA) es otra de las patologías que afecta a las articulaciones. Se trata de una degeneración del colágeno articular no provocada por autoinmunidad, en la que los extremos de dos huesos desarrollan fricción mecánica entre ellos. Es la enfermedad articular con más prevalencia, produciéndose en el 10% de los hombres y el 18% de las mujeres mayores de 60 años⁴⁷. La artroplastia se usa para reemplazar quirúrgicamente el tejido dañado y recomponer la articulación.

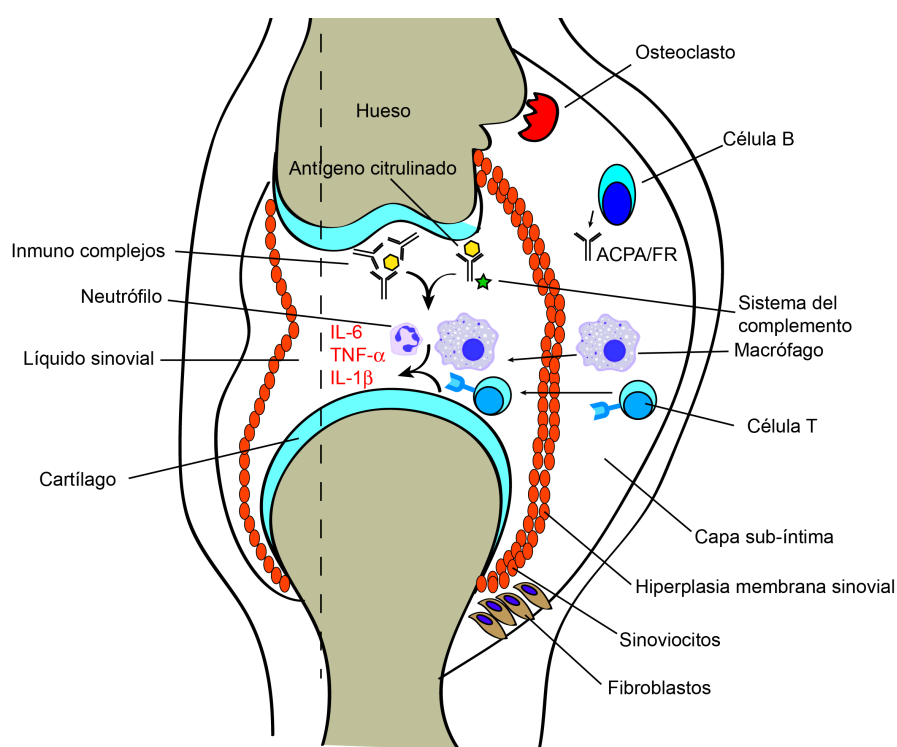


Fig. 3. Esquema de una articulación sana (izquierda) y de una con AR (derecha), y las poblaciones celulares implicadas. Adaptado de⁴⁵.

2.1 Implicación de los macrófagos en la respuesta autoinmune asociada a AR.

Los MΦ son un factor clave en el desarrollo de la AR a juzgar por la correlación que presenta el número de MΦ infiltrados en la membrana sinovial en pacientes con AR activa y el deterioro de la articulación. Estas células poseen capacidades proinflamatorias y destructoras que contribuyen a la progresión de la AR. No está bien definida la causa principal por la que se produce la respuesta inflamatoria en AR. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos anti-FR y anticitrulina forman inmunocomplejos que activan a los MΦ⁴⁸ y al sistema del complemento. Además, la activación de la trampa extracelular de los neutrófilos (NET) que se produce en el líquido sinovial es mediada por los ACPA, y presenta grandes cantidades de proteínas citrulinadas que amplifican la respuesta⁴⁵. La activación de los MΦ hace que se liberen prostaglandinas, citoquinas y quimioquinas al medio, produciendo una respuesta inflamatoria por la que se reclutan nuevas células del sistema inmune. Aunque ambos tipos de macrófagos (M1 y M2) están presentes en el tejido sinovial de pacientes de AR, las citoquinas proinflamatorias que generan los MΦ M1, como TNFα, IL-1β e IL-6, son abundantes en el tejido de AR y contribuyen a la inflamación y destrucción de los tejidos. Además, los fármacos que bloquean las funciones de los MΦ, o de las citoquinas que éstos generan, suelen ser efectivos en el tratamiento de la AR, coincidiendo con la disminución del número de MΦ en el tejido sinovial^{49,50}.

2.2 microRNAs en AR.

Se ha descrito en pacientes de AR presentan una expresión diferencial de miRNAs que puede afectar a la progresión de la enfermedad^{51,52} (Tabla 1). Conocer la regulación de éstos miRNAs es por tanto importante desde el punto de vista terapéutico.

Tabla 1. Papel de miRNAs descritos en AR. Adaptado de⁵².

miRNAs	Respuestas inmune e inflamatorias	
	Regulación de linfocitos T	Respuesta inflamatoria
miR-146a	+	+
let-7a	+	
miR-26	+	
miR-146b	+	
miR-150	+	
miR-132	+	
miR-16	+	
miR-21	+	
miR-323-3p	+	+
miR-155	+	+
miR-34a		
miR-15a		
miR-124a		
miR-223		+
miR-19a/b		-
miR-203		+

+ = regulador positivo - = regulador negativo

La expresión específica de miRNAs en los macrófagos de AR ha sido poco estudiada. Se ha descrito la sobreexpresión del miR-155 y miR-146 en el tejido sinovial de AR comparado con OA y en respuesta a estímulos inflamatorios^{53,54}. Teniendo en cuenta el papel clave de los macrófagos en el desarrollo de la enfermedad, consideramos que

sería adecuado realizar un estudio de los miRNAs diferencialmente expresados específicamente en estas células, tanto en condiciones de AR como en condiciones inflamatorias no autoinmunes, como la OA.

2.2.1 miR-223.

El miR-223 está localizado en el cromosoma X, se le atribuyen funciones en la diferenciación de células del linaje mieloide y se ha descrito en algunas alteraciones cancerosas e inmunitarias⁵⁵. Se transcribe de forma independiente por factores de transcripción claves del sistema hematopoyético como PU.1⁵⁶, LMO2⁵⁷, NFI-A y C/EBP α ; NFI-A y C/EBP α son dianas experimentales del miR-223 y compiten entre ellos por la unión al promotor del miR-223, creando *bucles* de retroalimentación negativa^{57,58}. El miR-223 cuenta con mayores niveles de expresión en granulocitos y neutrófilos⁵⁹. Sin embargo, en ratones deficientes para miR-223 el número de estos tipos celulares y de neutrófilos activados es mayor, sugiriendo que no es fundamental para su desarrollo⁶⁰. Aunque se han descrito más de 25 mRNAs dianas para el miR-223, su papel en los macrófagos se relaciona con las dianas NLRP3⁶¹, PKNOX1⁶², STAT3⁶³ y con la quinasa inhibidora del factor nuclear kappa-B subunidad alpha (IKK α)⁶⁴. El bloqueo de los tres primeros genes promueven una respuesta antiinflamatoria, mientras que el bloqueo de IKK α se ha mostrado capaz de promover la inducción adicional de citoquinas proinflamatorias específicamente en macrófagos estimulados^{65,66}. En enfermedades inflamatorias se ha encontrado una sobreexpresión del miR-223 en células T⁶⁷ y en el tejido sinovial⁶⁸ de pacientes con AR. La inhibición del miR-223 suprime el desarrollo de la enfermedad en un modelo de artritis inducida en ratón⁶⁹, y en otras enfermedades autoinmunes como encefalomiелitis (EAE)⁷⁰. En enfermedad inflamatoria intestinal también se ha localizado miR-223 sobreexpresado en la mucosa y en linfocitos, mediando la inhibición de un regulador negativo de IL17^{71,72}. La condición de modulación fina de los miRNAs y la multitud de dianas experimentales del miR-223 hacen que su expresión y funciones sean muy variables durante la diferenciación celular, según el tipo celular, el estado de activación y la desregulación en diferentes patologías. Por eso, es necesario caracterizarlo en el contexto en el que actúa.

2.3 La vía de señalización de Notch.

La proteína transmembrana heterodimérica Notch, junto a sus ligandos constituyen una ruta de señalización muy conservada entre especies. La vía Notch es capaz de regular el destino de múltiples tejidos durante el desarrollo y la homeostasis. En el sistema inmune actúa sobre la diferenciación de células mieloides y linfoides, y la

activación de linfocitos en la periferia⁷³. En mamíferos hay 4 receptores (Notch 1-4) y 5 ligandos (Delta1, Delta3, Delta4, Jagged1 y Jagged2). En la vía de señalización canónica, tras el contacto directo ligando-receptor se inducen una serie de actividades proteolíticas que escinden la parte intracelular del receptor; éste fragmento intracelular (NICD) se moviliza al núcleo para unirse a la proteína represora RBP-J y a diversos activadores de transcripción para estimular la transcripción de los genes dianas *hairy and enhancer of Split (HES)* y *hairy and enhancer of Split YRPW motif (HEY)*⁷⁴, que son represores de transcripción. Se ha descrito una vía no canónica que puede actuar independientemente de ligando, sin escindir NICD o independiente de RBP-J⁷⁵.

Los receptores Notch1 y Notch2 son muy similares en estructura, mientras que Notch3 y Notch4 poseen mayores diferencias en su parte intracelular y expresan un débil dominio transactivador (TAD)^{76,77}. Estudios bioquímicos indican que ese TAD reprime la transcripción de HES1, y compite con la parte intracelular de Notch1 (NICD1) por la unión al promotor⁷⁸. Por el contrario, estudios celulares observan los mismos efectos de Notch1 y Notch3 sobre HES1^{79,80,81}. La señal de la vía se puede modular de formas diferentes: dependiendo de la afinidad del ligando al receptor, de la inhibición producida por la expresión de ligando y receptor en la misma célula, según el número de estímulos, de la acción de enzimas que modifican los dominios extracelulares, según los factores de transcripción a los que se pueda asociar en el núcleo etc. Por tanto, el impacto de la señal es muy dependiente del contexto, encontrando efectos opuestos en diferentes sistemas o diferentes roles en el mismo tejido⁸².

Notch y sus ligandos se expresan en el tejido sinovial de AR⁸³ y en OA, sin diferencias en el nivel de los receptores⁸⁴, pero con posible translocación al núcleo de Notch1 en sinoviocitos de AR⁸⁵. Modelos murinos de artritis inducida, demuestran que la inhibición de la vía de Notch reduce la inflamación, si bien no se conoce el mecanismo y/o las células implicadas en el proceso⁸⁶. En células del sistema inmune, los diferentes receptores de Notch modulan, en distinto grado los niveles de las citoquinas proinflamatorias⁸⁷, siendo Notch1 el receptor que más influencia tiene sobre macrófagos M1⁸⁸. La vía de Notch se puede inducir por citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-1 β , abundantes en AR; o inhibirse con IFN γ , una citoquina activadora de macrófagos⁸⁹. En M Φ la activación de los TLR2/4 con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) ha sido ampliamente estudiada y promueve de forma indirecta el aumento de la expresión de los ligandos⁹⁰, de los receptores y de las dianas de Notch⁹¹, actuando en conjunto en la inducción de la vía. La vía de Notch, también coopera con la vía de NF-kB, al actuar NICD en la degradación de las subunidades inhibitorias de NF-kB; esto promueve la transcripción de los genes proinflamatorios⁸⁹.

Mientras que algunos estudios describen que los ligandos de Notch inducen citoquinas proinflamatorias en los $M\Phi$ ⁹², otros sólo observan este efecto en presencia de LPS⁹³. Hay trabajos que describen que la eliminación total de los receptores de Notch o el uso de inhibidores de la γ -secretasa, la enzima que genera el NICD, diferencia a los macrófagos hacia un fenotipo M2; sin embargo, las condiciones fisiológicas no son reproducibles en estos modelos^{94,95}. Cabe destacar que los modelos de la activación de los TLR con LPS inducen una respuesta inflamatoria muy fuerte en macrófagos que, contrariamente al rol proinflamatorio descrito, la vía de Notch puede disminuir. La inflamación por LPS induce la transcripción de los represores HES1 y HEY1, los cuales, reducen los niveles de citoquinas proinflamatorias⁹⁶. También la sobreexpresión de las formas intracelulares NICD1 y NICD2 disminuye el efecto inflamatorio de los TLR⁹³. Por tanto, alteraciones en los niveles de ligandos o receptores de Notch en $M\Phi$, podrían tener consecuencias sobre la producción de citoquinas proinflamatorias que son especialmente importantes en enfermedades autoinmunes, como la AR.

2.4 La vía del AhR/ARNT.

El *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) es un factor de transcripción que regula la respuesta inmune innata y adaptativa, el ciclo celular⁹⁷ y la señalización del receptor de estrógenos⁹⁸. Expresado en multitud de tejidos⁹⁹, en el citoplasma se encuentra inactivo formando un complejo con la *heat shock protein 90* (HSP90), *AhR interacting protein* (AIP) y p23. Se activa al unirse a dioxinas xenobióticas como el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), 3-metilcolantreno (3MC) o Benzo[a]pireno (BaP), y a ligandos endógenos derivados del metabolismo del triptófano como 6-Formil Indol(3,2-b)carbazol (FICZ), Indol(3,2-b)carbazol (ICZ), kinurenina (Kyn) y ester metílico del ácido 2-(1Hindol-3-ilcarbonil)-4-tiazolcarboxílico (ITE). Aunque con diferentes afinidades y estabilidades, la unión de los ligandos induce la translocación del AhR al núcleo donde se une a *AhR nuclear translocator* (ARNT)¹⁰⁰. ARNT, también llamado factor inducible por hipoxia (HIF)-1 β , es una proteína nuclear que responde a las condiciones ambientales uniéndose al AhR y a los factores de transcripción HIF-1 α y HIF-2 α . Aunque se nombre como HIF-1 β , sus niveles no son influenciados por la concentración de oxígeno, excepto en ciertas líneas tumorales¹⁰¹. El heterodímero AhR/ARNT se une a motivos específicos denominados elementos de respuesta a xenobióticos (XREs), en la región promotora de los genes diana e induce su expresión. Entre estos genes se encuentran los miembros de la familia del citocromo P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2* y *CYP1B1*) y el represor del AhR (*AhRR*), en un mecanismo de retroalimentación negativo¹⁰⁰. Se ha descrito la activación del AhR independientemente de ligando, aunque esta vía poco eficiente parece limitarse

a células tumorales¹⁰². Aunque no está suficientemente establecida, puede existir una ruta no consensuada de XRE independiente de ARNT¹⁰³.

El tabaco es una de los factores de riesgo que se correlaciona con el desarrollo de la AR⁴². En el humo del tabaco hay altas dosis de los ligandos exógenos del AhR: TCDD, 3MC y BaP, lo que apoya la relevancia de la vía AhR en la patología de AR¹⁰⁴. En fibroblastos de AR se han encontrado niveles elevados del AhR el cual induce las citoquinas proinflamatorias, IL-6 e IL-1 β tras la estimulación con agonistas exógenos¹⁰⁵. Las diferencias estructurales entre el AhR murino y humano se traducen en afinidades divergentes por sus ligandos; el AhR de ratón es 10 veces más afín por TCDD que el humano, el cual presenta mayor afinidad por los ligandos endógenos¹⁰². Pese a las diferencias, se han generado modelos de autoinmunidad en ratón deficientes en AhR (AhR^{-/-}). Los ratones AhR^{-/-} no presentan un fenotipo inmune característico, excepto cuando se exponen a estímulos inflamatorios¹⁰⁶. En modelos de AR inducida por vacunación con colágeno (CIA), los ratones AhR^{-/-} presentan menores niveles de citoquinas proinflamatorias en sangre y la patología se reduce¹⁰⁷. En modelos de encefalomiелitis, en los ratones silvestres se potencia la aparición temprana de la patología mediante la inducción de la vía con el ligando endógeno FICZ, mientras que los ratones AhR^{-/-} mantienen una respuesta lesiva similar^{108,109}. Otros estudios corroboran el efecto potenciador de FICZ sobre la patología; sin embargo, la activación del AhR con otros ligandos como TCDD o ITE disminuyó la lesión¹¹⁰. Además, la utilización de ratones con un AhR mutado que es menos afín por sus ligandos, aumentó la inflamación^{110,111}, lo que indica un comportamiento dependiente de ligando. Estas diferencias pueden deberse a que los ligandos poseen diferentes tasas de metabolización por parte de los CYPs y afinidades por AhR. Se relacionan las patologías a la unión que produce la señalización del AhR sobre el promotor de FOXP3, conocido por promover células CD4⁺ T_{REG}, las cuales tienen mayores cantidades del AhR con respecto a las células CD4⁺ T_H17¹¹⁰. También puede existir un efecto positivo de los ligandos del AhR en la generación de células T_H17^{109,112}.

Eliminar AhR en los M Φ no tiene el mismo efecto que en las células T¹⁰⁷. En los M Φ AhR se expresa constitutivamente y se induce con estímulos del TLR¹¹³, ejerciendo una acción antiinflamatoria. De hecho, el tratamiento de ratones AhR^{-/-} con LPS aumenta las citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-18 ϵ IL-12) que causan choque séptico^{114–116}. La unión del AHR-STAT1 al promotor de IL-6 en macrófagos de ratón, inhibe la acción transcripcional de NF κ B¹¹⁴. También en ratones, el AhR reduce la IL-1 β al aumentar la transcripción del inhibidor PAI-2¹¹⁵. Las partículas de combustibles diesel también son agonistas del AhR, mostrándose antiinflamatorias en M Φ humanos

estimulados con LPS¹¹⁷. Otro modo en el que AhR disminuye las citoquinas proinflamatorias es inhibiendo la transcripción de la proteína NLRP3, que forma parte del inflamosoma¹¹⁸. También se ha descrito que AhR induce inmunotolerancia mediante la expresión de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima implicada en producir kinurenina con efecto inmunosupresor^{119,120}. En la línea humana de macrófagos THP-1, la activación del AhR con BaP contribuye a la deficiencia de vitamina D¹²¹, deficiencia relacionada con AR¹²². Los agonistas del AhR también participan en el aumento de la expresión de la quimioquina CCL20¹²³ y de la integrina $\beta 7$ ¹²⁴ en M Φ favoreciendo la acumulación de células inflamatorias. Teniendo en cuenta el control que ejerce la vía AhR sobre citoquinas proinflamatorias, podría tener relevancia el estudio de la regulación del AhR sobre los M Φ de AR.

3. Regulación de la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T.

La desregulación de las células T, bien por factores genéticos o ambientales, es un elemento clave en la génesis, la promoción y la progresión de las enfermedades autoinmunes. Los factores genéticos pueden incrementar la susceptibilidad del reconocimiento de antígenos propios mediante defectos en la presentación antigénica, cambio de afinidades del TCR o fallos en la selección del timo. Los factores ambientales pueden potenciar la producción de factores proinflamatorios o producir nuevas reacciones específicas de antígeno¹²⁵, como ya se mencionó anteriormente. La respuesta adaptativa posee mecanismos de control adicionales para sobreponerse a las reacciones autoinmunes, inhibiendo la respuesta de las células T en la periferia.

3.1 Activación de los linfocitos T por antígeno.

La activación de las células T (Fig. 4) está mediada por el receptor de antígeno de la célula T o TCR, el cual reconoce el antígeno asociado a los MHC tipo I o tipo II en las APC. Esto conduce a la formación de una estructura en los linfocitos T denominada sinapsis inmune, en la que se agrupan el TCR y los receptores estimuladores CD8, CD4 o CD28. CD4 y CD8 activan la src quinasa LCK y la consiguiente fosforilación de las cadenas de CD3 en los dominios intracelulares *inmunoreceptor con motivos de activación basados en tirosina* (ITAM), que permite el reclutamiento de FYN. La quinasa ZAP70, también fosforilada por LCK y FYN, fosforila a la proteína transmembrana LAT en múltiples residuos; LAT recluta a numerosas moléculas de señalización para finalmente activar a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), implicadas en supervivencia, proliferación, diferenciación y motilidad celular. LAT también recluta a PLC γ 1, la cual, hidroliza el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol1,4,5-trifosfato (IP₃); éste provoca la salida de calcio del

retículo endoplasmático e induce la translocación de NFAT (mediada por calcineurina) y CREB al núcleo para aumentar la producción de IL-2. El DAG recluta la proteína quinasa C- θ (PKC θ) y RasGRP, la cual activa la GTPasa RAS, un factor crucial activador de la señalización de las MAPK (Fig. 4). ZAP70 también fosforila a p38, promoviendo la proliferación y producción de citoquinas. En el caso de la señalización de CD28, su dominio intracelular es fosforilado por LCK que sirve como lugar de anclaje de PI3K, generando así fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), activando AKT y promoviendo la proliferación y supervivencia a través de la ruta mTOR y PKC θ para activar los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. La activación mediada por el TCR conlleva una reorganización del centro organizador de microtubulos (MTOC) y la liberación dirigida de vesículas intracelulares, implicando activamente al citoesqueleto, para reforzar la estructura de la sinapsis inmune madura^{126–128}.

3.2 La vía PD-1/PD-L1.

Inicialmente el *Programmed cell death-1* (PD-1 o CD279) fue descrito en su relación con la apoptosis¹²⁹, aunque finalmente ha quedado claro que está implicado en la inhibición de la respuesta inmune. PD-1 es un receptor coinhibidor que tras su activación por unión a sus ligandos (PD-L1 o B7-H1 o CD274 y PD-L2 o B7-DC o CD273), suprime la activación de los leucocitos. Es un receptor transmembrana monomérico de 288 aminoácidos, que presenta en la región extracelular un dominio IgV y dos dominios intracitoplásmicos tipo *inmunoreceptor con motivos inhibidores basados en tirosina* (ITIM) y *tipo motivos conmutadores* (ITSM). Se expresa en células inmunes como células T, NK, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células B y células dendríticas^{130–134}, y es inducible en células T por activación de TCR y por citoquinas^{135–137}. La inducción del PD-1 es transitoria, pero en estados de estimulación constante sus niveles se mantienen elevados llevando a las células CD8⁺ a un estado exhausto¹³⁸.

La transcripción del gen del PD-1 (*PDCD1*) se induce por NFAT2¹³⁹; también FOXO1¹⁴⁰, Notch¹⁴¹, STAT¹³⁷ e IRF9¹³⁶ promueven su transcripción. Por el contrario, T-BET y BLIMP-1 son represores^{142,143}. Su nivel de expresión se correlaciona inversamente con la metilación de su promotor¹⁴⁴. PD-L1 y PD-L2 se inducen con la activación y con citoquinas proinflamatorias¹⁴⁵. Aunque la afinidad de PD-L2 por el receptor sea de tres veces superior a la del PD-L1, existe un mayor número de estudios analizando la interacción del PD-1 con PD-L1, dado que este se expresa en muchos subtipos de células cancerosas. PD-L1 también se expresa constitutivamente en células T y otras células hematopoyéticas, y PD-L1 también puede unirse a CD80 en células T e inhibir su activación¹⁴⁶. Es relevante la expresión del PD-L1 en lugares inmuno privilegiados, como

los testículos, el ojo o la placenta y en órganos esenciales para prevenir la autoinmunidad¹⁴⁷. Existe una forma soluble del PD-1 (sPD-1) capaz de unirse a los ligandos, evitando el contacto con el receptor PD-1 en las células que lo expresen; también existen formas solubles del PD-L1 y PD-L2^{148,149}.

La unión de los ligandos a PD-1 provoca la fosforilación de dos tirosinas en los dominios ITIM e ITSM y el reclutamiento, cerca del TCR, de las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 en estudios *in vitro*, pero sólo de SHP-2 en imágenes de la sinapsis inmune¹⁵⁰. Estas fosfatasa defosforilan los componentes de la señalización del TCR: LCK, CD3 ζ , ZAP70 y PKC θ . Inhibiendo PLC γ 1 y RAS, PD-1 causa la inactivación de MEK-ERK, sin inhibir la ruta p38 MAPK^{151,152,153}. PD-1 también inhibe la ruta PI3K-AKT al aumentar la actividad de PTEN mediada por CK2¹⁵⁴ (Fig. 4). Recientemente se ha descrito que, en respuesta a activación por PD-L1, SHP-2 defosforila la parte interna del coreceptor CD28 con mayor afinidad que el TCR, resaltando el papel clave de la vía coestimuladora¹⁵⁵. A nivel transcripcional se ha visto el aumento de expresión de BATF mediado por PD-1¹⁵⁶. La activación de la vía PD-1/PD-L1 tiene un impacto negativo en la duración de los contactos con las APC y en la expresión del TCR¹⁵⁷. Todos estas actividades hacen que PD-1 inhiba la función efectora de los linfocitos T, constituyéndose así como un mecanismo de tolerancia periférica para evitar la autoinmunidad y la sobreestimulación de la respuesta inmune¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. En este sentido, los ratones deficientes para PD-1 desarrollan o son más susceptibles a padecer enfermedades autoinmunes^{161,162}.

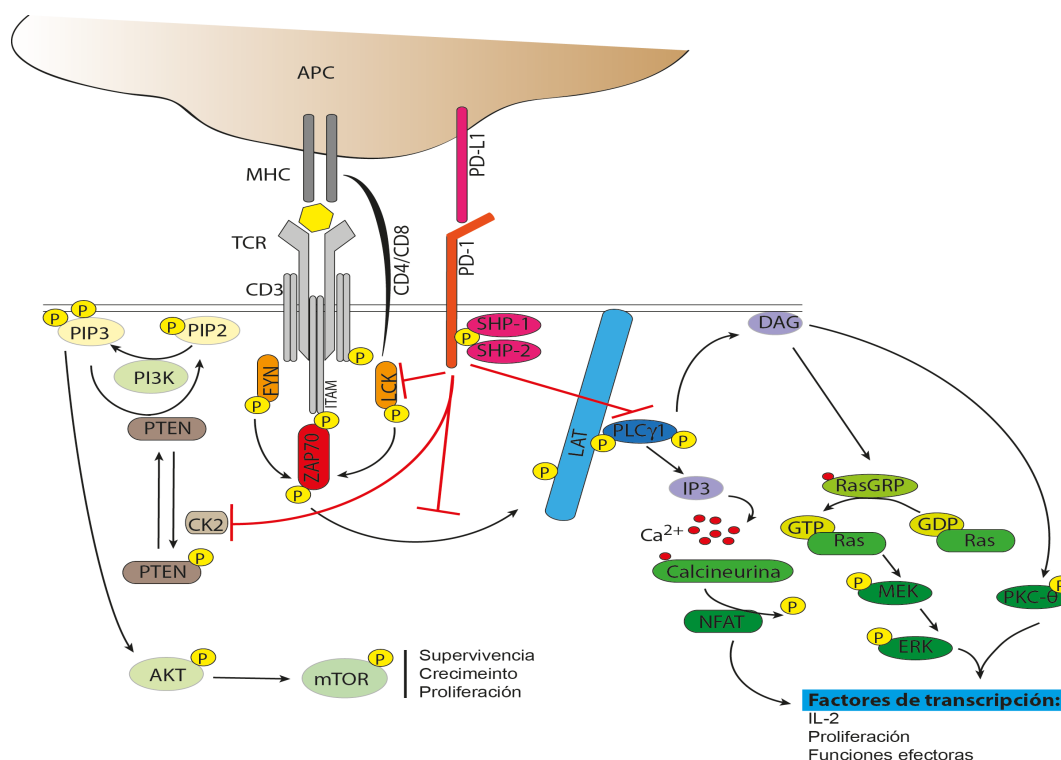


Fig. 4. Esquema de rutas de señalización mediadas por TCR y PD-1 en células T. Adaptado de¹⁵⁹.

3.3 El metabolismo en la activación y diferenciación de las células T.

Inmunometabolismo se define como el uso y utilización de las rutas metabólicas intracelulares que se producen en las células inmunes. La estimulación de células T *naïve* (que no han recibido estímulo) o de memoria a través del TCR y de los receptores coestimuladores provoca el cambio a un estado activado y adquisición de función efectora, que se caracteriza por una alta tasa de crecimiento y proliferación, secreción de citoquinas y de moléculas citotóxicas junto con un aumento capacidad migratoria. Estas respuestas implican la generación de nuevas proteínas, duplicaciones de material genético y nuevas membranas, con el consiguiente gasto energético y requerimiento de sustratos extracelulares. Por tanto, las células han de cambiar su metabolismo para atender a los incrementos de demandas bioenergéticas. Las principales rutas metabólicas implicadas en este proceso son la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la fosforilación oxidativa (OXPHOS), la oxidación (FAO) y síntesis de los ácidos grasos, y el metabolismo de los aminoácidos (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de rutas metabólicas. Adaptado de¹²⁸.

Proceso metabólico	Descripción	Sustrato
Glucólisis	Catabolismo de un azúcar de 6 carbonos a dos moléculas de piruvato. El piruvato puede ser transformado a lactato o catabolizado en el TCA.	Glucosa
TCA	Reacciones químicas en serie catalizadas por enzimas en la que se reducen moléculas de NAD ⁺ , usadas como sustrato en la OXPHOS.	Acetil-CoA
OXPHOS	Oxidación de intermediarios en la CTE que generan un gradiente de protones que permite la síntesis de ATP.	NADH, FADH ₂
FAO	Catabolismo de ácidos grasos en acetil-CoA, usado en TCA para la generación de ATP en la CTE.	Ácidos grasos
Síntesis de ácidos grasos	Proceso anabólico para la generación de ácidos grasos.	Acetil-CoA Malonil-CoA
Glutaminólisis	Catabolismo de glutamina para la generación de piruvato o intermediarios del TCA.	Glutamina

Las células T naïve se caracterizan por un metabolismo catabólico; la toma de nutrientes es baja y tienen niveles basales de glucólisis. Obtienen energía principalmente de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y de la glucólisis aeróbica para producir piruvato (Fig. 5).

Las células T activadas pasan a tener un metabolismo anabólico, con síntesis neta de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Hay un aumento drástico de la entrada y consumo de glucosa y aminoácidos, que son utilizados también como fuente de intermediarios metabólicos. Tras la activación, las células T obtienen energía preferentemente a través de la ruta glucolítica¹⁶³. Mediante la glucólisis aeróbica se generan dos moléculas de ATP por unidad de glucosa e intermediarios biosintéticos. También se genera NADPH, utilizado como cofactor en múltiples enzimas, oxidado si se produce lactato¹⁶⁴. Es necesaria la utilización de la vía catabólica de la glutamina¹⁶⁵, glutaminólisis, como fuente de energía tras la generación del ácido α -cetoglutarico que entrará en el ciclo TCA, además de fuente de carbono y nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y de lípidos. Para la correcta activación celular es fundamental el aumento de la biogénesis mitocondrial y el ciclo TCA¹⁶⁶. Los metabolitos generados en la mitocondria, como las especies reactivas de oxígeno (mROS) son necesarios para la activación de células T ya que potencian la acción del factor de transcripción NFAT¹⁶⁷; también el citrato producido en el ciclo de Krebs es exportado al citosol, lo que aumenta la producción de IFN γ ¹⁶⁸. La transición hacia células T_{MEM} vuelve a un metabolismo quiescente, potenciando la utilización de FAO para generar energía vía OXPHOS y mantiene unos niveles elevados de masa mitocondrial para responder rápidamente a la reestimulación antigénica. (Fig. 5).

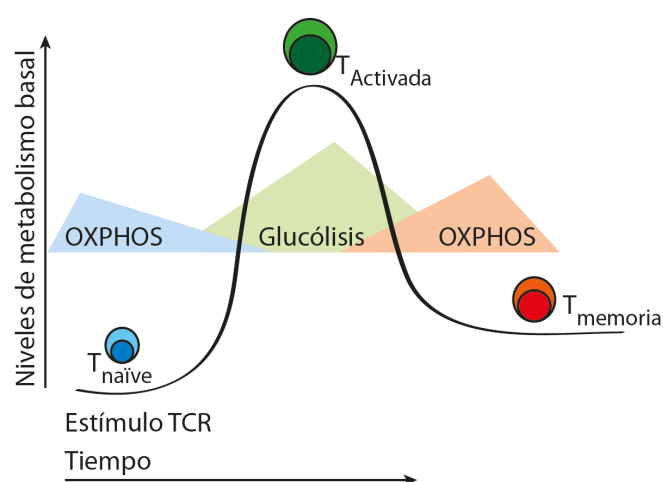


Fig. 5. Cambios en el metabolismo en respuesta a estímulo.

La mitocondria es el orgánulo celular que gobierna el metabolismo celular y el que genera mayor cantidad de ATP por oxidación de nutrientes. Presenta una membrana

externa estructural y permeable a productos citosólicos mediado por porinas, y otra interna impermeable en la que se encuentran los diferentes complejos respiratorios que forman la cadena de transporte de electrones (CTE) que generan un gradiente de potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) utilizado por la ATP-sintetasa para producir ATP. Estos complejos respiratorios son 4 y se pueden agrupar en supercomplejos para aumentar la eficiencia de la respiración. La membrana interna que soporta los 4 complejos, forma invaginaciones alargadas denominadas crestas que aumentan la superficie donde tiene lugar la respiración mitocondrial¹⁶⁹. Estas crestas varían en longitud, número y grosor según el estado metabólico de la célula. Recientemente se han descrito complejos proteicos necesarios para la formación y mantenimiento de las crestas mitocondriales, denominados sitio de contacto mitocondriales y sistemas de organización de crestas (MICOS). Las subunidades “MIC” forman los complejos MICOS y anclan la membrana interna a la externa mediante su unión a los complejos SAM, los cuales están ubicados en la membrana externa. En conjunto, forman los complejos de unión de espacio intermembrana mitocondrial (MIB), creando las invaginaciones de la membrana interna que dan lugar a las crestas mitocondriales¹⁷⁰. La eliminación de algunas proteínas del complejo MICOS, como CHCHD3 (*MIC19*) y CHCHD10 (*MIC14*), desorganizan la estructura de las crestas impidiendo la CTE^{170–172}. Las mitocondrias son muy dinámicas, se fusionan, fisionan, se crean, se destruyen y se mueven para formar redes y controlar su funcionalidad según los requerimientos energéticos de la célula. El balance entre fusión y fisión controla el “destino” de las células T reprogramando el metabolismo celular. Así, en las células CD8⁺ de memoria las mitocondrias están fusionadas, favoreciendo la OXPHOS y FAO; mientras que en las células CD8⁺ efectoras las mitocondrias están fisionadas, reduciendo la eficiencia de la CTE y promoviendo la glicólisis aeróbica^{173,174}.

3.3.1 La vía PD-L1 y el metabolismo celular.

Teniendo en cuenta las implicaciones de la señalización del PD-1/PD-L1 en la reprogramación de las células T, no es sorprendente que el metabolismo celular haya emergido como una nueva diana de PD-1. Estudios en células T CD4⁺ humanas muestran que, tras la unión de PD-L1, PD-1 detiene el transporte y la utilización de glucosa, el catabolismo de aminoácidos y la producción de ATP. Por otro lado, PD-1 promueve la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos endógenos aumentando los niveles de CPT1A y de enzimas lipolíticas. Así, las células en las que se ha estimulado PD-1 usan FAO y OXPHOS en lugar de glucólisis para generar energía y mantener un fenotipo anérgico sin entrar en apoptosis¹⁷⁵.

El análisis metabolómico en un modelo tumoral en ratones KO para PD-1 mostró menores niveles de compuestos intermediarios del TCA, tanto en el suero como los CTLs que infiltran a los tumores (TILs); esto indica un mayor consumo y actividad de las vías mitocondriales. Este resultado es similar al obtenido en ratones silvestres tratados con anticuerpos anti-PD-1, en los que además se observó que los CTLs tenían más masa mitocondrial, mayor potencial de membrana y mayor producción de ROS¹⁷⁶. En conjunto, estos resultados sugieren que el bloqueo del PD-1 podría conducir a la activación mitocondrial.

Mediante un modelo de infección vírica crónica (utilizando el clon 13 de la meningitis linfocitaria), el TCR de las células CD8⁺ se encuentra continuamente estimulado y lleva a las células T a un estado exhausto. Estas células se caracterizan por tener baja función efectora, con bloqueo del consumo de glucosa y de OXPHOS y alta expresión de receptores coinhibidores como PD-1; poseen más mitocondrias, un aumento de la fusión mitocondrial, más producción de ROS, pero paradójicamente, sus mitocondrias son menos funcionales al tener un menor potencial de membrana. El bloqueo de la vía PD-1 con anticuerpos revierte las alteraciones metabólicas y las células presentan menor masa de mitocondrias y mayor consumo de glucosa¹⁷⁷. Estos resultados sugieren que las alteraciones metabólicas controladas por PD-1 son las que determinarían el estado exhausto de las CD8⁺ citotóxicas. Otros trabajos, sin embargo, no ven esa relación. Así, se ha observado una reducción de la masa mitocondrial y de la captación de glucosa en TILs; estas alteraciones parecen ser consecuencia del microambiente tumoral y no de la activación del PD-1. Tampoco se encontró que la expresión del PD-1 en los TILs, o el bloqueo del PD-1 con anticuerpos monoclonales, alteraran la masa mitocondrial en dichas células¹⁷⁸.

Ya que el metabolismo mitocondrial defectuoso es el que determinaría la disfuncionalidad en células CD4⁺ y CD8⁺ exhaustas, varios grupos coinciden en señalar el papel de PGC1 α en la respuesta antitumoral por ser un regulador clave en la biogénesis mitocondrial. La sobreexpresión de PGC1 α , que es menos abundante en los TILs, recuperaría el metabolismo mitocondrial y la función efectora antitumoral de células T^{177,178}. PD-1 podría tener un funcionamiento similar en células CD8⁺ humanas, convirtiendo el metabolismo celular en una diana clave de la inmunoterapia.

En este trabajo se estudiará el efecto de la señalización del receptor PD-1 en células T CD8⁺ sobre la transcripción de sus genes, para poder determinar los mecanismos por los que se produce la disfunción efectora de las células T, atendiendo a la forma en la que PD-1 influye en la reprogramación metabólica.

OBJETIVOS

1. Función de los microRNAs desregulados en los macrófagos derivados de líquido sinovial de pacientes de artritis reumatoide.

- 1.1 Identificación de miRs diferencialmente expresados en macrófagos de pacientes con AR y OA.
- 1.2 Identificación del miR-223 como un microRNA aumentado específicamente en macrófagos de pacientes de AR.
- 1.3 Identificación de vías de señalización implicadas en la regulación de la expresión del miR-223.
- 1.4 Identificación de las dianas del miR-223, y su relación con la expresión de citoquinas proinflamatorias.
- 1.5 Validación de las dianas del miR-223 en modelos celulares y en tejidos de pacientes de AR y OA.

2. Identificación del programa transcripcional inducido por PD-1 durante la activación primaria de células T CD8⁺ humanas.

- 2.1 Puesta a punto y validación de un modelo *ex vivo* para el estudio de la señalización por PD-1.
- 2.2 Identificación de los cambios temporales en los perfiles de expresión de linfocitos T CD8⁺ en condiciones de activación, y tras la estimulación de PD-1.
- 2.3 Caracterización de los genes mitocondriales alterados por la estimulación por PD-1, y su función sobre el fenotipo y función de las mitocondrias de los linfocitos T CD8⁺.
- 2.4 Caracterización de las alteraciones metabólicas inducidas por PD-1.
- 2.5 Sobreexpresión de proteínas del complejo MICOS para intentar revertir los defectos mitocondriales en las células hCD8⁺ estimuladas con PD-L1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de pacientes o donantes humanos.

Los macrófagos se obtuvieron del líquido sinovial de rodillas de pacientes con artritis activa y en los pacientes de OA se obtuvieron del tejido sinovial procedente de artroscopias. El tejido fue tratado con colagenasa I al 0,2% durante 1 hora a 37°C (Stem Cell Technologies). Los macrófagos se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque plus (1.077g/ml, GE-Healthcare). A partir del total de células del anillo blanco de la interfase tras la centrifugación, se purificaron por selección positiva células CD14⁺ usando el kit con esferas magnéticas *CD14 MicroBeads human* (Miltenyi Biotec). La edad media de los pacientes de AR fue de 63±5 años siendo un 73% mujeres; para OA 73±6 años y un 57% mujeres.

Los tejidos sinoviales para inmunohistoquímica fueron obtenidos de biopsias de artroscopias en rodillas de pacientes de AR con enfermedad activa (n=13) o a partir de sinovectomías de pacientes de OA (n=8) en los que se reemplazó la articulación. Las muestras fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina por los servicios de histología hospitalarios. Los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento para este estudio que fue aprobado por los comités de ética del Hospital 12 de Octubre (Madrid, España) y del Hospital Clinic (Barcelona, España).

Los linfocitos T hCD8⁺ se obtuvieron a partir de sangre venosa de donantes sanos procedente del banco de Sangre de la Comunidad de Madrid. Se purificaron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque plus y a partir del anillo blanco de la interfase, se enriquecieron por selección negativa con *EasySep human CD8+ enrichment kit* (StemCell Technologies).

2. Extracción de ARN y de ADN.

El ARN se extrajo con el reactivo *Tri-Reagent* (Sigma-Aldrich), para el ARN total de hasta 5x10⁵ células hCD8⁺ se usó *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) y *RNeasy Mini Kit* hasta 1x10⁷ células, o *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) cuando se analizaron los microRNA. El ARN se cuantificó en un *NanoDrop* (ThermoFisher).

El ADN total se extrajo usando el kit *DNeasy Blood and tissue* (Qiagen). El ADN plasmídico fue amplificado en *Escherichia coli* en presencia de los antibióticos de resistencia que porta el plásmido, y se preparó con el kit *Plasmid Maxi* (Qiagen), y en su versión *Endofree* para los plásmidos usados en experimentos con células susceptibles a endotoxinas.

Se siguió en todos los casos el protocolo del fabricante.

3. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Para las retrotranscripciones (RT) de miRNAs a partir del ARN total (25ng) se usó el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription*, (Life Technologies) y cebadores específicos de cada miRNA, determinados por la casa comercial, de cada miRNA. Para las RT de mRNA, se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems) usando cebadores aleatorios. Para la amplificación cuantitativa (qPCR) de miRNAs se usó un sistema basado en *Taqman MicroRNA* (Life Technologies) específico para cada miRNA (Life Technologies), y para los mRNAs se usaron cebadores específicos de cada gen (Tabla 3) utilizando la mezcla de reacción *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROS)* (Solis BioDyne). Las qPCR se hicieron en placas de 384 pocillos en el equipo *ABI PRISM 7900 HT* (Applied Biosystems), amplificando 5 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. Se calculó el valor Ct medio de muestras por triplicado utilizando el software SDS del equipo. La cantidad relativa (RQ, $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de cada miRNA o mRNA se determinó usando como normalizador las Ct obtenidas de la amplificación con la sonda Taqman de U6 (Thermo Fischer), para miRNA, o la amplificación del RNA ribosómico 18S o β -actina para los mRNA.

Para la cuantificación relativa del ADN mitocondrial se usó ADN total (10ng) y se aplicó el procedimiento de qPCR, cuantificando el gen mitocondrial MT-TL1 (que codifica para el ARN de transferencia de la leucina, tRNA^{LEU(UUR)}) y como normalizador el gen nuclear β 2-microglobulina que sólo posee una copia^{179,180}.

Tabla 3. Listado de los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis Doctoral.

Gen	Secuencia (5' - 3')	
	Cebador directo	Cebador reverso
<i>18S rRNA</i>	GAGAAACGGCTACCACATCC	GGGTCGGGAGTGGGTAAT
<i>ADHFE1</i>	CAGCGGTGTTCACTTTCACG	GCATCTTGATCCTGGCAGT
<i>BATF</i>	ACTGAAAATCTTTGAACCACCAG	TTGCAAGCAGTCTTGAGTGAC
<i>BHLE40</i>	GGAATAAAGCGGAGCGAGGA	CGTGCTTGCCAGATACTGA
<i>C11ORF21</i>	TGACAGGTGGACGGGAAC	CTGCAGGTGGCATCATTG
<i>CCDC65</i>	AGTAATGCCACCCTCAAGGC	TGAATCCCCTCCTGCTCCTT

<i>CECR1</i>	TCCGAATCAAGTTCCCCACG	TCCGGCGTGGAAGAAGTAAG
<i>CHCHD10</i>	CTGTGGGACACGTCATGG	AACTGCCTGATCTCGTAGGC
<i>CHCHD3</i>	AGGCGGACGAGAATGAGAAC	GCACCAGAATACCGCTGAGA
<i>CTRL</i>	CCCTAAGCCTGGTTCTCCTC	AGCTCAGTGCCGGTTTGAT
<i>CYP1A1</i>	CCCAGGCTCCAAGAGTCCACCC	GCCAGAAGAACTCCGTGGCCG
<i>CYP1B1</i>	ACATCTTCGGCGCCAGCCAGG	TCCCTCCCCACGACCTGATCCA
<i>DLL1</i>	GAGCGTGGGGAGAAAGTGT	ATGCTGCTCATCACATCCAG
<i>DLL4</i>	GCACTCCCTGGCAATGTACT	GGAGTGGTGGGTGCAGTAGT
<i>DRP</i>	AGAAAATGGGGTGAAGCAGA	TGAATTGGTTCAGGGCTTACTCC
<i>DSC1</i>	ACAAGGAGCATTGACCGTGA	TCTGGTGCATAGCCATCTGC
<i>DUSP4</i>	GGTTTTCTCCGAGTACCCA	AAGGATCTCCACAGGACCCC
<i>FCRL6</i>	CCAGATACCACCCACAGCTC	CCACGGTGAAGTCAGCAGAC
<i>HES1</i>	GTGAAGCACCTCCGGAAC	GTCACCTCGTTCATGCACTC
<i>HEY1</i>	CGAGCTGGACGAGACCAT	CTAGAGCCGAAGTCAAGTTTCC
<i>HSPA9</i>	GGACTATCGCTCCATGCCAA	TGGGGCTCTGCCAAAAAGAT
<i>IFNγ-AS1</i>	ACGAAGTAGCACAACGAGGA	TCCCTGCATGAGGAATGAGC
<i>IKKα</i>	TGTGCCTCTTCTAGCAATGGA	TTCTGGTTTGTTGAGCAGCTT
<i>IL-1β</i>	CCCTAAACAGATGAAGTGCTCCTT	GTAGCTGGATGCCGCCAT
<i>IL-6</i>	CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA	GGCGCTTGTGGAGAAGGAG
<i>JAG1</i>	GTCCTAAGCATGGGTCTTGC	GGGTGTGGGATGCACTTATC
<i>JAG2</i>	GTCGTCATCCCCCTTCCAGT	GGTGGTATCGTTGTCCCAGT
<i>LAYN</i>	GAAACACAGGAAGAAGATGCC	GGGGAATGCTGGGGATTAGG
<i>MEGF6</i>	CTATCAGCTAGCAGCGGACG	GTGACACACGCACTTGAAGG
<i>MIEF</i>	GGGACATGTACTTGAGTGGCA	CAAGGGGCACAATGAGTTGG

<i>MPF1</i>	CTTTCCGCTCTCTTGTGCCA	TCCAGGAGGAAATCCACCGA
<i>MTFP1</i>	CTTTCCGCTCTCTTGTGCCA	TCCAGGAGGAAATCCACCGA
<i>MFR2</i>	CTTCGCTCTCAGATTGCAGC	ACCCAAACTAATGCGCTCGT
<i>MYOT</i>	GCTGAAATGCAAGGACACCC	TCTGAGTTGTGTTGCTGCGA
<i>NOTCH1</i>	TACAAGTGCAACTGCCTGCT	GGCAGACACAGGAGAAGCTC
<i>NOTCH2</i>	TCAGCCGGGATACCTATGAG	TTTGACAGGGATGAGACAG
<i>NOTCH3</i>	CGTGGCTTCTTTCTACTGTGC	CGTTCACCGGATTGTGTGC
<i>OPA</i>	GTGGCGACTACGTCGGG	AATGCTTCGTGAAACCAGATG
<i>PHP</i>	ATCCCGTGGGTACAGAAACC	GAGGATGCGCAGTGTGATGT
<i>PINK</i>	CCATCTGGTTCAACAGGGCA	AAATCTGCGATCACCAGCCA
<i>PTPN13</i>	GCAGTCAGGATCATCAAACACC	GTACCGTGACACTTATCCCCA
<i>RBBP8</i>	GAGGGAACAGCAGAAAGTCCT	GCGATCACATAAGCCTGCTCT
<i>RP11-539L10.2</i>	TCACAGCGAGGAACTTGGTC	TCAGCCTCCTCCCTCATCAA
<i>SULT1B1</i>	GAAGAATCCATCACCCCGGA	TCCTTGGCATTACGAGCCAG
<i>TENM1</i>	CACAGTGACTTTGGCCTTGTT	GTTGCAACTGCCAAGTCAGG
<i>TICAM2</i>	CTGACTGTGGTGGCGCTC	ACACTGTGCCTTTTACCCCAA
<i>TRIB2</i>	TGTTCTACCAGATTGCCTCGG	CCGCAGAATGTAGGCGTCTT
<i>MT-TL1 tRNA(Leu)(UUR)</i>	CACCCAAGAACAGGGTTTGT	TGCCATGGGTATGTTGTTA
<i>TSPAN32</i>	GCTTCCTGTGCTTCTCCCTG	ACCTTTCATCGCCTGCTCAT
β -actina (<i>ACTB</i>)	CCCAGCACAATGAAGATCAA	CCCAGCACAATGAAGATCAA
β 2-microglobulina (<i>B2M</i>)	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT

4. miRNA array y RNA-seq.

- *Array de microRNAs*: se analizó la integridad del ARN por electroferograma en *Bioanalyzer 2100* (Aligent). El ARN total (1µg) se marcó con el kit *miRCURY LNA microRNA Hy3/Hy5 Power* y se hibridaron en platinas con el kit humano *miRCURY LNA microRNA Array v.11.0* (Exiqon). Las platinas fueron escaneadas a 5 µm de resolución en un escáner *Axon 4000B* (Molecular Devices), y cuantificadas con el software *GenePix 5.0*. Los datos crudos de las muestras de pacientes con artritis reumatoide se depositaron en la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ipilmwaerdujfw&acc=GSE63745>). Los valores fueron normalizados y analizada su expresión diferencial con el software *Bioconductor Limma*. La tasa de falsos positivos (FDR) fue usada para corregir los valores-p. Las hibridaciones y el análisis estadístico fueron realizados por el servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). El programa FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>) desarrollado por el Dr. J.C. Oliveros, fue utilizado para visualizar los resultados de los microarrays.

- *RNA-seq*: Se mezclaron las células hCD8⁺ de tres donantes independientes sometidas a diferentes condiciones y tiempos para formar una muestra, a la que se extrajo su ARN. Se enviaron tres muestras independientes de ARN por cada condición y tiempo al servicio de Genómica del CRAG (*Center for Research in Agricultural Genomics*, Barcelona), donde se realizó el procesamiento y análisis las mismas. La librería para la secuenciación masiva de ARN se preparó usando el kit *TruSeq Stranded Total RNA* (Illumina Inc.) según el protocolo del fabricante. Resumidamente, el ARN total se deplecionó de ARN ribosómico utilizando *RiboZero Magnetic Gold Kit* y fue fragmentado en fragmentos de 80-450 nucleótidos. Se sintetizaron las hebras de ADN complementario y en la segunda ronda se sustituyó la desoxitimidina trifosfato (dTTP) por desoxiuridina trifosfato (dUTP) para lograr identificar la direccionalidad del ARN. Los adaptadores marcados se ligaron a las secuencias, seguidos de 15 ciclos de PCR para amplificar la librería. El tamaño y la calidad de la librería se determinó con el kit *DNA 7500 Bioanalyzer* (Aligent). Cada librería se secuenció con el kit *TruSeq SBS v3-HS en Hiseq200* (Illumina) siguiendo el protocolo del fabricante. El análisis de las lecturas se hizo con el programa *Real Time Analysis* (RTA 1.13.48) y la generación de archivos de secuencia FASTQ con el programa *CASAVA 1.8*.

El alineamiento de las lecturas del RNA-seq con el genoma de referencia humano v19 se hizo con el programa *GEMtools RNA-seq pipeline v1.7* (<http://gemtools.github.io>). La cuantificación de la expresión de cada gen fue calculada con el programa *Flux*

(<https://omictools.com/the-flux-capacitor-tool>). Las cuantificaciones de expresión también se normalizaron y analizaron para su expresión diferencial con el software *Bioconductor Limma*. La expresión de genes de ACT y ACT+PD-L1 a diferentes tiempos se comparó con la de IgG, considerado como tiempo “0” para cada experimento. Los genes expresados en ACT y ACT+PD-L1 se compararon entre ellos, para cada uno de los tiempos. Seleccionados los genes con un *false discovery rate* (FDR)<0,05 y una tasa de cambio (o veces de inducción) (TC)>2 se representaron con un diagrama de *Venn* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). El análisis estadístico y la representación de *Heatmap* fue realizado por el servicio de Genómica del CNB aplicando el visualizador FIESTA.

Los datos del RNA-seq se analizaron con el paquete *DESeq2* del programa *Bioconductor*¹⁸¹, con el se obtuvieron: el análisis de disimilitud entre muestras, la distancia euclidiana, el análisis de componentes principales, la agrupación jerárquica y los diagramas MA. Las cuentas de las lecturas se normalizaron por el tamaño efectivo de la librería. Analizado por el Centro Andaluz de Estudios Bioinformáticos (CAEBI, Sevilla, España).

5. Análisis informáticos.

5.1 Identificación de las dianas del miR-223.

Las secuencias de la región 3'-UTR del gen de ARNT, del miRNA maduro hsa-miR-223-3p y del hsa-miR-223-5p se obtuvieron de la base de datos de *Ensembl* (lanzamiento 72, Junio 2013) y de *miRBase* (lanzamiento 19, Agosto 2012). De los 12 transcritos asignados para el gen de ARNT, sólo 6 tenían 3'-UTR registrada. Las predicciones se hicieron con los algoritmos *miRanda*, *PITA*, *FindTar v3.11.12*, *RNAHybrid* y *TargetScan v6* con los parámetros por defecto. Las secuencias de 6, 7 y 8 nucleótidos de cada final miRNA 5' fueron consideradas región semilla, comenzando desde el primero, segundo o tercer nucleótido; no se permitieron “mismatches” en la región semilla. Los alineamientos múltiples se realizaron con *ClustalW v2.1*. *Ingenuity pathway analysis* (IPA) se usó para conocer las posibles vías dianas del miR-223. El análisis informático se realizó en el servicio de Bioinformática del CNB.

5.2 Análisis GSEA.

Los datos crudos del *microarray* de células mononucleares derivadas de médula ósea (BMDC) procedentes de 10 pacientes con OA y 9 con AR se obtuvieron de una base de datos pública (GSE27390)¹⁸². Los datos se normalizaron utilizando la aproximación *Robust Multi-array average* (RMA) (*cuantil*) y se sometieron al análisis *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA, <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), permutado 1000 veces por fenotipo. Los datos de expresión de GSE49604¹⁸³ se re-analizaron utilizando la normalización por cuantil y sometiendo a GSEA permutado 1000 veces por set de genes. El enriquecimiento se determinó con el set de genes específico de *NOTCH* (Tabla 4) y *AHR* (Tabla 5).

Tabla 4. Lista de los genes usados en análisis GSEA (GSI_Notch).

AKAP1	GIMAP7	MATR3	PPIF
APRT	GNL3	MKI67IP	PPP4R2
BXDC1	GPATC4	MRPL24	PPRC1
BYSL	GTPBP4	MRPL4	PSMB5
C1ORF33	HEATR1	MYC	PUS1
C6ORF66	HES1	NAT10	PUS7
CCDC86	HES4	NLN	PWP2H
CTPS	HK2	NOB1	RNU3IP2
D21S2056E	HSPC111	NOL1	RRS1
DHX33	IFRD2	NOL6	SHQ1
DKC1	ISG20L1	NOLC1	SLC19A1
DNAJC11	JTV1	P2RX5	SLC29A1
DPH2	KIAA0664	PDSS1	SLC44A1
DTX1	KIAA0922	POLR1C	TRMT1
ETF1	LOC199800	POLR3E	USP36
EVL	LOC348180	POLR3H	WDR12
FKBP4	LYAR	POLR3K	WDR74
GIMAP6	LZTFL1	PPAN	ZCD1

Tabla 5. Lista de los genes del *AHR* geneset usados en análisis GSEA.

AHR	DDB1	NCOA7	SRC
AIP	EP300	NCOR2	STUB1
ARNT	ESR1	NEDD8	SUMO2
ARNTL	FOXA1	NFE2L2	TAF4
BRCA1	GTF2F1	NR2F1	TAF6
CTNNB1	GTF2F2	NRIP1	TAF9
CYP1A1	HSP90AA1	RB1	TBP
CYP1A2	IVNS1ABP	RELA	UBC
CYP1B1	MAF	SMARCA4	
DAP3	NCOA1	SP1	

5.3 Agrupación por categorías de genes diferencialmente expresados.

Los datos del RNA-seq se analizaron con la herramienta *likelihood ratio test* (LRT) para encontrar diferencias específicas de clase (entre las condiciones ACT y ACT+PD-L1) durante el tiempo. Este efecto de clase específico fue aceptado para valor de $p < 0,05$ y valores de $TC > 2$. Los genes así seleccionados fueron analizados para el enriquecimiento en *KEGG*, base de datos para las rutas de señalización usando la herramienta *Webgestalt* (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>). De estos, los genes con un valor de p significativo se analizaron con la base de datos *Gene Ontology* (GO,

<http://geneontology.org>) y la herramienta BINGO en la plataforma Cytoscape para conocer categorías sobrerrepresentadas estadísticamente significativas. También se analizaron utilizando el programa *Short Time Expression Miner*¹⁸⁴ (STEM) para agrupar los genes en patrones temporales de expresión. Los patrones temporales de tendencia alcista para ACT comparado con ACT+PD-L1, se resumieron y visualizaron utilizando el programa REVIGO. Realizado por CAEBI.

6. Cultivo celular.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron los tipos celulares que se describen a continuación:

THP-1: Línea celular humana monocítica y fagocítica derivada de leucemia linfoblástica aguda. Procedentes del banco *American Type Culture Collection* (ATCC) Se cultivaron en *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (BioWest), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, L-glutamina a 2mM, penicilina/estreptomicina a 100U/ml y 2-mercaptoetanol a 0,05mM.

OP-9: línea de ratón tipo-fibroblasto. Las células OP-9 transducidas con las construcciones retrovirales pLZRS-IRES-eGFP sin inserto o con inserto codificante para los ligandos de Notch JAG1, JAG2, DLL1 o DLL4, fueron cedidas por la Dra. M^a Luisa Toribio (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España); la expresión de los ligandos de Notch se verificó por PCR. Las células OP-9 y sus subclones, se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM)- α (ThermoFisher) suplementado con FBS al 20%, piruvato sódico a 1mM, L-glutamina a 2mM, penicilina/estreptomicina a 100U/ml y bicarbonato sódico a 3mM.

HEK-293T: línea humana de células de riñón embrionario que expresa el antígeno T “large” del virus SV40. Procedentes de ATCC. Se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; BioWest) suplementado con FBS al 10%, piruvato sódico a 1mM, L-glutamina a 2mM, 1% de aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomicina a 100U/ml.

hCD8⁺: linfocitos T CD8⁺ humanos se cultivaron en RPMI 1640 (BioWest) suplementado con FBS al 10%, L-glutamina a 2mM, penicilina/estreptomicina a 100U/ml y HEPES a 10mM.

Las células se crecieron a 37°C en atmósfera saturada de humedad, con un 5% de CO₂

en un incubador termostatzado. Para despegar las células adherentes de la superficie de crecimiento, se lavaron con PBS, se trataron con una solución de tripsina-EDTA durante 2-3 minutos a 37°C y se centrifugaron en presencia de medio de cultivo. Las células HEK-293T se despegaron y se diluyeron cuando llegaron a confluencia en la placa de cultivo. Las células OP-9 se lavaron con DPBS (ThermoFischer) y se despegaron y diluyeron cuando alcanzaron un 80% de confluencia aproximadamente. Las células que crecen en suspensión se mantuvieron a densidades de $0,2-0,8 \times 10^6$ células/ml para las THP-1 y $1-2 \times 10^6$ de células/ml para las hCD8⁺.

7. Transfección de células HEK-293T y ensayos luciferasa.

Las células HEK-293T se transfectaron con el plásmido con la secuencia humana de HEY-1 o HES-1 (cedido por Dr. J.L de la Pompa; Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, España) usando *jet-PEI* (Polyplus). Para la transfección de los vectores pLV-hsa-miR-223 y pLV-miR-control (Biosettia) se usó el método del fosfato cálcico. Las células fueron seleccionadas con Puromicina (3µg/ml) y transfectadas con *miTarget 3'-UTR miRNA Target Clones* (GeneCopoeia) para los 3'-UTR de ARNT e IKKα bajo el promotor del gen de la luciferasa *firefly* humana, junto a la secuencia de la luciferasa tipo *renilla* como control interno (vector pEZX-MT06). La actividad del promotor fue ensayada con el sistema indicador Dual-luciferasa (Promega) y medida en un luminómetro (Infinite 200, TECAN) en muestras por cuadruplicado. La actividad relativa fue calculada como el cociente entre actividad *firefly* y actividad *renilla*.

8. Cocultivo de monocitos con células OP-9.

Se cocultivaron células CD14⁺ purificadas (>95%) de donantes sanos con células OP-9 que expresaban, o no, los ligandos de Notch y en presencia de DAPT (25µM) (Merck Milipore) o DMSO como vehículo control (Vhcl) (misma cantidad que DAPT, Sigma Aldrich). Tras 1 hora a 37°C los monocitos fueron separados por “*cell sorting*” por la ausencia de expresión de GFP mediante *MoFlo XDP* (Beckman Coulter). El cocultivo se hizo también plaqueando las CD14⁺ en *transwell* (0,4 µm de tamaño de poro; Costar) para evitar la interacción entre las células OP-9 y los monocitos.

9. Transfección y estimulación de células THP-1.

Las células THP-1 se transfectaron con pre-miR-223 (10µM; Life Technologies) o con un control negativo fluorescente recomendado por el fabricante (5µM; Life Technologies) usando el nucleofector *Amaza I* con el kit *Monocyte Nucleofector* (Lonza). Las células tranfectadas (~95% según análisis por citometría) se estimularon durante 3 horas a 37°C

con BaP (5 μ M) o con DMSO como vehículo control, seguido de LPS (10ng/ml) (1 hora, 37°C). Se midió la concentración de las citoquinas IL-6, IL-1 β e IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares por ELISA en triplicados usando los kits de alta sensibilidad IL-6, IL-1 β y TNF- α *human uncoated ELISA* (eBioscience). La concentración (pg/ml) se dividió por la cantidad total de proteína en extractos celulares para corregir por el número de células.

10. Estimulación de linfocitos T y monocitos humanos.

Los linfocitos T CD8⁺ (1x10⁶ células/ml) se estimularon en suspensión con esferas magnéticas (*Dynabeads M-450* Tosil-activadas, Thermo Fisher) recubiertas con el estímulo en un ratio célula:esferas de 1:3,5. Para la condición IgG se recubrieron con anticuerpos IgG (*Normal human IgG control*, R&D systems); en la condición ACT con anti-CD3 (8% de anti-CD3, HIT3a, BD Biosciences), anti-CD28 (10% de anti-CD28.2, Biolegend) e IgG (82%); y en la condición ACT+PD-L1 con anti-CD3 (8%), anti-CD28 (10%) y la proteína quimérica PD-L1-Fc (82%, R&D systems). Porcentajes del total de μ g recomendados por el fabricante para hibridar las esferas.

Los monocitos humanos (1x10⁶ células/ml) se estimularon con IFN γ a 25ng/ml (Preprotech) y/o TNF α a 10ng/ml (Preprotech) durante 1,3,6 y 10 horas.

11. Ensayos de proliferación celular.

Para determinar la proliferación celular se utilizó la incorporación de timidina tritiada (Metil-³H-TdR, Perkin Elmer) a las nuevas hebras de ADN sintetizado. Las células se dispusieron en placas de 96 pocillos a 1x10⁶ células/ml en 100 μ l en el medio de cultivo y 0.5 μ Ci/pocillo de Metil-³H. La incorporación del nucleótido radiactivo fue durante 16h y el ADN marcado se pasó a membranas de celulosa mediante un *Filtermate Harvester* y se midieron las c.p.m. en un 1450 *Microbeta liquid scintillation counter* (Perkin Elmer) en muestras por cuadruplicado.

12. Transducción de células hCD8⁺.

Los plásmidos lentivirales de expresión de CHCHD3 y CHCHD10 (Genecopoeia) pertenecen al sistema de vector lentiviral de tercera generación. Las proteínas CHCHD3 y CHCHD10 se expresaron bajo el control del promotor EF1 α y se coexpresó EGFP mediado por secuencia IRES.

Las partículas lentivirales recombinantes se obtuvieron por cotransfección transitoria de las células empaquetadoras HEK-293T con el plásmido de expresión lentiviral, el plásmido con la envuelta VSVG viral (pMDG2-VSVG), el pMDLg/pRRE que contiene genes para *gag* y *pol*, proteína estructural del virión y polimerasa, respectivamente; y el pRSV-Rev que contiene el gen *rev* del virus, regulador transcripcional necesario para la expresión de gag-pol. Las HEK-293T se transfectaron por el método del fosfato cálcico con los plásmidos en la proporción 30:8:15:8 y los sobrenadantes virales se recogieron a las 48h y se concentraron por centrifugación (2h, 14000xg, rotor SW28) obteniendo títulos de $1-2 \times 10^8$ TU/ml, según se determinó por citometría en HEK-293T.

Las T hCD8⁺ purificadas se mantuvieron durante 6h con IL-2 (50U/ml, Prepotech) antes de transducirlas con la solución viral. En la transducción se usó un M.O.I. de 10-20 en presencia de polibreno 8µg/ml y centrifugando durante 2h, 800xg a 37°C. La solución viral se mantuvo en el cultivo durante 16 horas a la que se añadió IL-2 50U/ml. El virus se retiró y a las 24h se estimularon las células con IgG, ACT o ACT+PDL1. A las 48h se analizó por citometría de flujo el porcentaje de población verde y la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y el potencial de membrana mitocondrial por tinción con TMRM.

13. Inmuno-ensayos.

13.1 Inmunoblot.

Los extractos de proteínas fueron obtenidos con el tampón de lisis celular RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8,0, NaCl 150mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0,5% y SDS 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 10µg/ml, aprotinina 10µg/ml, NaF 5mM). Los extractos de proteínas se cuantificaron con el kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce). Las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el método Laemmli usando el tampón de electroforesis Tris-Glicina. La transferencia se hizo en membrana de nitrocelulosa y el bloqueo con leche desnatada al 5% en TBS-Tween20 al 0.1%. En el caso de necesitar deshibridar los anticuerpos se usó una solución de Tris-HCl 65,5mM, SDS 2% y 2-mercaptoetanol 100mM a 56°C durante 30 minutos. Tras la hibridación con los anticuerpos primarios (Tabla 6) y secundarios (utilizados según indicaciones del fabricante) acoplados al enzima peroxidasa (HRP *horseradish peroxidase*), se reveló con el sustrato quimioluminiscente ECL (Amersham).

Para la extracción de los complejos mitocondriales, más insolubles, se utilizó un tampón Tris-HCl 50mM pH 8,0, EDTA 20mM y Tritón X-100 0,5%; las muestras se calentaron a 50°C durante 20 minutos antes de someterlas a la electroforesis. Los niveles proteicos de ARNT fueron analizados en extractos proteicos nucleares con el protocolo previamente descrito¹⁸⁵.

Tabla 6. Anticuerpos primarios usados en inmunoblot. Cuando el fabricante no indica concentración, se indica la dilución utilizada.

Anticuerpo	Concentración o Dilución	Casa comercial
Anti-AhR	1:1000	ThermoFisher (RPT1)
Anti-ARNT	1:1000	Cell Signaling (D28F3)
Anti-CHCHD10	2µg/ml	Sigma-Aldrich (HPA003440)
Anti-CHCHD3	5µg/ml	Sigma-Aldrich (HPA042935)
Anti-Core2	1µg/ml	Abcam (14745)
Anti-CPT1A	0,5µg/ml	Sigma-Aldrich (HPA008835)
Anti-HDHA	1µg/ml	Abcam (54477)
Anti-hnRNP	1µg/ml	Abcam (10297)
Anti-HSP60	1:2000	Acebo et al. ¹⁸⁶
Anti-MTFR2	1:100	Sigma-Aldrich (HPA029792)
Anti-SDH-B	2µg/ml	ThermoFisher (459230)
Anti-β-actina	0,16µg/ml	Sigma-Aldrich (AC-15)
Anti-β-F1ATPasa	1:20000	Acebo et al. ¹⁸⁶

13.2 Citometría de flujo.

Las células se recogieron y las proteínas se tiñeron con los anticuerpos indicados (Tabla 7) en condiciones saturantes en PBS *staining* durante 30 minutos a 4°C. Para diferenciar células vivas de muertas se marcó el ADN con yoduro de propidio a 2,5µg/test (IP 0,5µg/ul, BeckmanCoulter) durante 1 minuto, o 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a 3µM durante 10 minutos a 4°C (Sigma). Para las tinciones intracelulares la células se trataron con Brefeldina A (Sigma) a 10µg/ml durante 4 horas seguido del kit de permeabilización de Beckman Coulter, según las indicaciones del fabricante. Los receptores FC se bloquearon con una mezcla en condiciones saturantes de anti-CD16 y anti-CD32. Los ensayos de citometría se realizaron en citómetro Cytomics FC500 o Gallios, (Beckman Coulter) y se analizaron con el software Kaluza.

Tabla 7. Anticuerpos acoplados a fluoróforos que reconocen proteínas humanas utilizados en el trabajo.

Anticuerpo	Casa comercial	Clon
Anti-CD14-PCy5.5	BeckmanCoulter	RMO52
Anti-CD25-PE	BeckmanCoulter	B1.49.9
Anti-CD279-APC (anti-PD-1)	eBioscience	MIH4
Anti-CD69-PCy5	Inmunotech	TP1.553
Anti-CD8-FITC	BeckmanCoulter	B9.11
Anti-IFN γ -PE	Pharmigen	B27

Los controles de isotipo mouse IgG1-FITC (Beckman Coulter), mouse IgG2a-PCy5.5 (Beckman Coulter), mouse IgG2a-PE (Beckman Coulter), mouse IgG1-PE (Pharmigen) y mouse IgG1-APC (Biolegend), se usaron a la misma concentración que los anticuerpos sobre los que se desea conocer la tinción inespecífica.

13.3 Determinación de masa y potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Las células se tiñeron con las sonda *Mitotracker Green FM* (MTG) a 50ng/ml para determinar la masa mitocondrial. Para medir el potencial de membrana se usó el colorante éster metílico tetrametilrodamina (TMRM) (Thermo Fisher) a 40nM; TMRM es un compuesto permeable que se acumula en mitocondrias activas dependiendo del potencial de membrana. El desacoplador de potencial de membrana 2,4-dinitrofenol (DNP) a 750 μ M fue usado para determinar los niveles de tinción no-dependiente de potencial. Las células en HBSS se incubaron a 37°C con 5%CO₂ durante 20 minutos en oscuridad con los colorantes fluorescentes y la fluorescencia fue medida por citometría de flujo (Gallios, Beckman Coulter). Se utilizó un marcaje con DAPI para seleccionar las células vivas.

13.4 Tinción de células por inmunofluorescencia.

Las células hCD8⁺ se incubaron 1 hora a 37°C sobre portaobjetos de cristal de 8 pocillos de 6mm de diámetro (EM sciences) pretratados con poli-L-lisina a 50 μ g/ml para adherirlas a la superficie. Las HEK-293T se crecieron (18 horas) sobre porta objetos de 8 pocillos poli-L-lisina a 50 μ g/ml (Sigma-Aldrich). Se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA) durante 10 min a temperatura ambiente (TA), se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 durante 5min a TA y se bloquearon durante 1 hora en PBS-*staining* (1%FBS, 0,5%BSA, 0,065%NaN₃); con 3 lavados de PBS entre cada paso. La hibridación con el

anticuerpo primario (Tabla 8) se llevó a cabo durante 16 horas a 4°C, y con el secundario durante 1 hora a TA. Las hibridaciones se montaron con *Prolong Gold* y DAPI (1:200) (Cell Signaling) y se analizaron en un microscopio confocal *Olympus FluoView 1000* o con un microscopio Leica Microsystems (LAS X v2.0.1) usando el objetivo 60x. Las tinciones se procesaron con el programa *ImageJ* (NIH).

Para las medidas de la morfología mitocondrial se usó un macro para el programa ImageJ¹⁸⁷ (http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:morphology:mitochondrial_morphology_macro Plug-in:start). Las células teñidas con la proteína mitocondrial Aconitasa-2 se procesaron en el macro del programa ImageJ modificando los colores a escala de grises para determinar la fluorescencia específica en las mitocondrias y un umbral apropiado para resolver visualmente la forma mitocondrial. Se representó el término de “circularidad” media en escala de 0 a 1 (donde 1 es un círculo perfecto) identificado por el programa para cada célula. El área mitocondrial se obtuvo con el programa ImageJ para la superficie ocupada por la tinción con Aconitasa-2.

Tabla 8. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Cantidad (µl)	Casa comercial
Anti-Aconitasa-2	2µg/ml	Abcam (6F12BD9)
Anti-HA	1µg/ml	Biolegend (16B12)
Anti-CHCHD3	2,5µg/ml	Sigma-Aldrich (HPA333440)
Anti-CHCHD10	1µg/ml	Sigma-Aldrich (HPA042935)
Anticuerpos secundarios		
Goat anti-mouse Alexa 488	10µg/ml	Molecular Probes
Goat anti-mouse IgG Cy3	5µg/ml	Jackson
Goat anti-rabbit IgG Cy5	5µg/ml	Jackson

13.5 Inmunohistoquímica de tejido sinovial.

El tejido embebido en parafina se cortó en secciones que se fijaron en portaobjetos. Las secciones fueron pre-tratadas por calentamiento en microondas con tampón citrato pH 6.0 o en buffer Tris-EDTA pH 9.0 para la detección de CYP1B1 y ARNT, respectivamente. Las muestras fueron teñidas con anticuerpos anti-IKKα (ab47453), anti-

CYP1B1 (novusbio 5e2) o anti-ARNT (Cell Signaling D28F3) según las instrucciones del fabricante. Para el revelado se usó un método de marcaje indirecto avidina-peroxidasa (ABC standard, Vector laboratories) y revelado con diaminobenzidina. La tinción de CYP1B1 y CD68 fueron realizadas simultáneamente con anticuerpos anti-CYP1B1 asociado a peroxidasa y un secundario anti-peroxidasa Alexa488 y anti-CD68 y anticuerpo secundario Alexa594. Como control negativo se usó IgG (Molecular Probes). Las muestras se contra-tiñeron con Hematoxilina de Mayer (Sigma). Las muestras se visualizaron en un microscopio A1 (Zeiss) y las imágenes se adquirieron con una cámara AxioCam ERc 5S y el software Zen Lite 2012 y cuantificadas con el programa ImageJ. Las tinciones fueron realizadas en el Hospital 12 de Octubre.

14. Microscopía electrónica de barrido.

Las células, en las condiciones de IgG, ACT y ACT+PD-L1, tras 48 horas de estímulo se centrifugaron, y se añadió fijador (glutaraldehído 2%, ácido tánico 1% en HEPES 0,4M pH 7,2) suavemente y se dejó 2 horas a TA; se centrifugó la muestra y se resuspendió en HEPES 0,4M. En el servicio de Microscopía Electrónica del CNB, se trataron con tetróxido de osmio al 1% en ferricianuro potásico al 0,8% durante 1 hora a 4°C; después de lavar 3 veces con HEPES se incubaron con acetato de uranilo al 2% durante 40 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con agua destilada. Seguidamente se sometieron a deshidratación en series crecientes de acetona a 4°C, se embebieron en resina Epon 812 y se polimerizaron a 60°C durante 48h. Se realizaron cortes ultrafinos de 60-70 nm de grosor en un ultramicrotomo *Leica EM UC6* y se recogieron sobre rejillas de cobre de 200 mesh. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo siguiendo métodos convencionales. El análisis de las muestras se realizó en un microscopio *Jeol JEM 1011* operando a 100 kV y las imágenes se obtuvieron mediante una cámara *Gatan Eraglanshen ES1000W*.

14.1 Cuantificación de estructuras mitocondriales.

El número de mitocondrias por célula y el de crestas por mitocondria se cuantificó a partir de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Dos individuos, de forma independiente, realizaron el conteo. La medida de longitud de las crestas mitocondriales se obtuvo con el programa ImageJ.

15. Ensayos metabólicos.

15.1 Determinación de respiración mitocondrial y glucólisis.

La tasa de consumo de oxígeno celular (OCR) y la tasa de la acidificación del medio (ECAR) se midió en linfocitos hCD8⁺ tras 48 horas de estímulo bajo las condiciones de IgG, ACT y ACT+PD-L1 en un *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience; Agilent Technologies). La placa con los sensores se hidrataron con buffer de calibrado según indica el fabricante. Las células se lavaron y se resuspendieron en el medio basal no tamponado (*Seahorse XF Base Medium*; Agilent Technologies) suplementado con glucosa 25mM (Sigma-Aldrich), L-glutamina 2mM, (BioWest) y Piruvato sódico 1mM, (BioWest) ajustando a pH 7,4 el día de su uso. Se plaquearon 7×10^5 células en 100μl por pocillo de placas *XF24 (cell culture microplates*; Agilent Technologies), previamente tratadas con poli-L-lisina a 50μg/ml (Sigma-Aldrich) y se centrifugaron a 200xg durante 1 minuto para favorecer la adhesión celular. Tras 30 minutos a 37°C en estufa sin inyección de CO₂, se añadieron 600μl de medio basal suplementado y tras otros 30 minutos se procedió a las lecturas del consumo de oxígeno (en pMoles/min) y del cambio de pH (mpH/min). Se realizaron medidas a los 0, 6 y 13 min para determinar la respiración basal y a los 19, 25, 32, 38, 44 y 51 minutos en respuesta a la inyección de inhibidores de la cadena de transporte de electrones: minuto 13 oligomicina 1μM (inhibidor de la ATP sintasa o complejo V), minuto 25 Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 1,5μM (desacoplador de la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones) y minuto 38 rotenona/antimicina A 0,75μM (inhibidores de los complejos I y III de la CTE) del kit *XF cell Mito Stress* (Agilent technologies).

Se calcularon los parámetros de la función mitocondrial (Fig. 6): Respiración basal (la OCR inicial menos la OCR tras la inyección de rotenona/antimicina), la respiración máxima (OCR tras la inyección de FCCP), la capacidad respiratoria adicional o de reserva (SRC) (la OCR máxima menos la OCR basal), el SRC en porcentaje (la OCR máxima/basal x 100), la fuga de protones (la OCR tras la inyección de oligomicina menos la OCR tras la inyección de rotenona/antimicina). Datos obtenidos de los valores medios de las diferentes medidas correspondientes para cada parámetro mitocondrial (Fig. 6) junto al valor medio de tres experimentos independientes por duplicado.

De forma simultánea a las medidas de OCR también se obtuvo el dato de la acidificación del medio extracelular (ECAR) indicativo de la glucólisis basal, en la que se representó el dato de ECAR basal (calculada de igual manera que OCR basal).

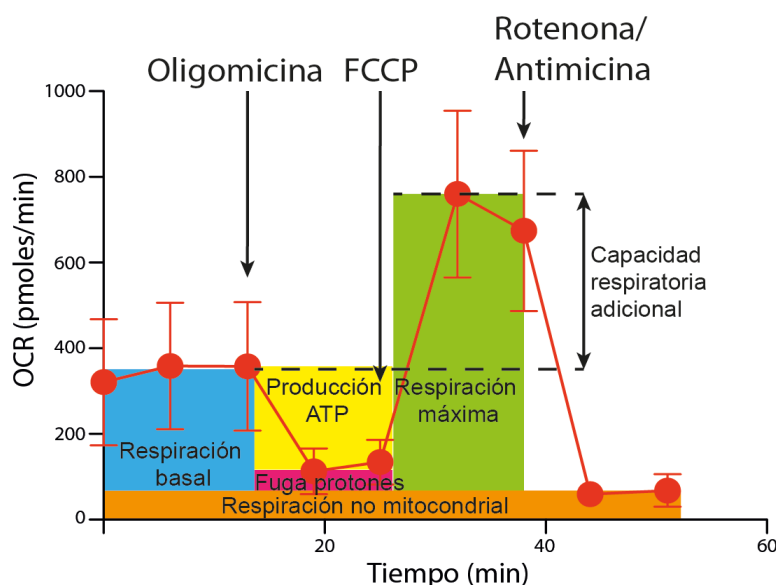


Fig. 6. Esquema representativo de los parámetros de función mitocondrial obtenido en el ensayo de OCR mediante *Seahorse XF*.

15.2 Determinación de lactato.

Los niveles de lactato se determinaron enzimáticamente en extractos celulares de células T IgG, ACT y ACT+PD-L1 tras 48 horas de estimulación utilizando un kit fluorométrico (Cell Biolabs) y siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, 6×10^6 cells/ml se lisaron en tampón de ensayo 1X mecánicamente con una aguja de calibre 30g en tampón de ensayo 1X. El material soluble obtenido tras la centrifugación ($12000 \times g$, 30min, $4^\circ C$), se ensayó en placas negras de 96 pocillos por triplicado y se midió la fluorescencia a 530/590nm de excitación/emisión en un lector de placas *Filter Max F5* (Molecular Devices). Para determinar la concentración de lactato (mM) se usó una curva estándar de lactato y los valores se normalizaron por el número de células.

16. Análisis estadístico.

Para los datos con un número de réplicas superior a 15 ($n > 15$) se analizó la distribución de los datos aceptando una distribución normal o paramétrica cuando $p \geq 0,05$. Se aplicó el test *Mann-Whitney U-Test* para analizar las diferencias entre dos condiciones. Para las comparaciones múltiples no paramétricas se usó Kruskal-Wallis seguido de *Dunn's post-test* y para las múltiples paramétricas *One-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post-test*. *RM One-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post-test* se usó en estudios pareados, en los que la misma muestra recibe diferentes tratamientos. Para las comparaciones múltiples con dos variables se usó *Two-way ANOVA*. Cuando el valor p

resultó menor de 0,05 las diferencias se consideraron estadísticamente significativas $^*=p<0,05$, $^{**}=p<0,01$, $^{***}=p<0,001$. Todos los análisis estadísticos indicados fueron realizados con el programa Prism (GraphPad) en sus versiones 5.0 ó 7.0.

17. Nomenclatura.

Los símbolos de los genes, en mayúsculas y en cursiva, se escribieron siguiendo las indicaciones de *HUGO gene nomenclature committee*. Los símbolos de las proteínas, en mayúsculas, se escribieron siguiendo las recomendaciones de la *Universal Protein Resource* (UniProt).

RESULTADOS

1. Desregulación de la función de macrófagos sinoviales en artritis reumatoide por el miR-223.

1.1 Los macrófagos de pacientes con artritis reumatoide expresan un perfil de miRNAs específico.

Se quiso conocer el patrón de expresión de mirRNAs en macrófagos ($M\Phi$) sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (AR) activa, comparándolo con pacientes con osteoartritis (OA). Habitualmente para el tratamiento de la AR se elimina el líquido que genera la membrana o tejido sinovial, que posee un alto número de neutrófilos, linfocitos, células dendríticas y $M\Phi$. No existe extravasación celular directa desde la sangre al líquido sinovial⁴⁹, sino que migran desde el tejido sinovial. Utilizando el líquido sinovial, aislamos por selección positiva las células $CD14^+$, marcador de macrófagos/monocitos que corresponden mayoritariamente con $M\Phi$ ¹⁸⁸, los cuales exponen marcadores tipo $M1$ ¹⁸⁹. La OA no es una enfermedad inflamatoria, sino degenerativa, por lo que el líquido sinovial no cuenta con masa celular suficiente para aislar poblaciones. Sin embargo, como el tejido de OA se reemplaza en quirófano, hace posible aislar células $CD14^+$ presentes en el tejido. La pureza de las células $CD14^+$ purificadas de líquido sinovial o tejido fue >95% determinada por FACS (Fig. 7).

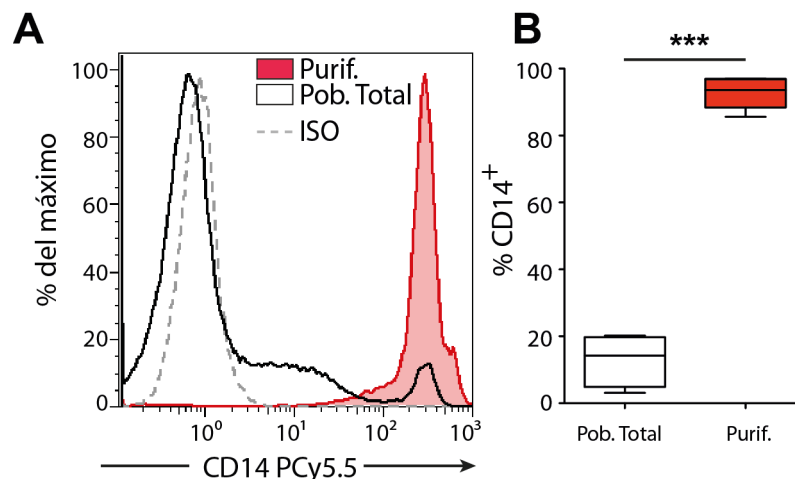


Fig. 7. Grado de purificación en células $CD14^+$. (A) Histograma de células procedentes del líquido sinovial (*Pob. Total*) marcadas con anti- $CD14$ -PCy5.5 y tras enriquecimiento por selección positiva (*Purif.*) analizado por citometría de flujo. Tinción con anticuerpo isotópico (*ISO*) no específico representado en línea discontinua. (B) Representación del porcentaje total de células $CD14^+$ de la muestra ($n=3$). A, resultados representativos de un donante. B, Valores medios \pm máx-mín., *** $p<0,001$ Mann-Whitney U-Test. Los resultados fueron similares para los pacientes de OA.

Se aisló ARN total de dichas células que, tras ser analizado para su integridad mediante Bioanalyzer, se utilizó en un microRNA *array* para conocer la expresión de miRNA de estos pacientes. Se hallaron 24 miRNAs diferencialmente regulados entre los MΦ de pacientes con AR y los aislados de pacientes con OA, aplicando un *false discovery rate* (FDR) <0.05 y una tasa de cambio (TC)>3 veces (Fig. 8A). Se analizaron 16 miRNAs por qPCR en células CD14⁺ aisladas de una cohorte independiente de pacientes de AR y OA, para validar su expresión diferencial. Ocho de los miRNAs fueron confirmados por qPCR: miR-223, miR-125b, miR-100, miR-99a, miR-199-5p, miR-199-3p, miR-214 y miR-152. (Fig. 8B); en el caso de miR-142-3p, miR-17, miR-20, miR-106a, miR-21, miR-142-5p, miR-34 y miR-146a se observó una tendencia en consonancia con el resultado del *array*, pero los valores no fueron estadísticamente significativos (Fig. 8C). Así, centramos el estudio en el miR-223 al ser el único miRNA cuya expresión era significativamente mayor en los pacientes con AR.

1.2 Los niveles del miR-223 no están regulados por citoquinas proinflamatorias.

Se quiso comprobar si la expresión diferencial de los miRNAs validados entre los macrófagos de AR y OA era consecuencia de la exposición de dichas células a las citoquinas proinflamatorias presentes en el líquido sinovial. Se aislaron monocitos de sangre periférica de individuos sanos y se diferenciaron *in vitro* a MΦ durante 7 días usando líquido sinovial de pacientes de AR y OA; la expresión de miRNAs se analizó por RT-qPCR. Se observó una disminución en los niveles de miR-125b, miR-99, miR-199-3p y miR-214 en presencia de líquido sinovial de AR comparado con OA (Fig. 9A), lo que estaba en consonancia con el resultado obtenido en el miRNA *array*. Por el contrario, los niveles del miR-223 disminuyeron cuando la diferenciación se produjo en presencia del líquido de AR (Fig. 9A). Los miR-152, miR-100 y miR-20a no mostraron cambios durante la diferenciación con líquido sinovial de AR ni de OA (Fig. 9B).

Se quiso testar el efecto directo de las citoquinas en la expresión del miR-223. Se cultivaron *in vitro* monocitos de individuos sanos con el TNF α y/o el IFN γ , dos de las citoquinas abundantes en el líquido sinovial de pacientes de AR¹⁹⁰, durante 1h, 3h, 6h y 10h. Los niveles del miR-223 no se vieron afectados por estas citoquinas (Fig. 9C). En la condición conjunta de ambas citoquinas (TNF α +IFN γ), miR-223 tiende a reducir sus niveles de 1h a las 10h de cultivo (p=0,078).

Estos resultados sugieren que la mayor expresión del miR-223 detectada en MΦ de AR no está determinada por las citoquinas proinflamatorias presentes en el líquido sinovial de dichos pacientes.

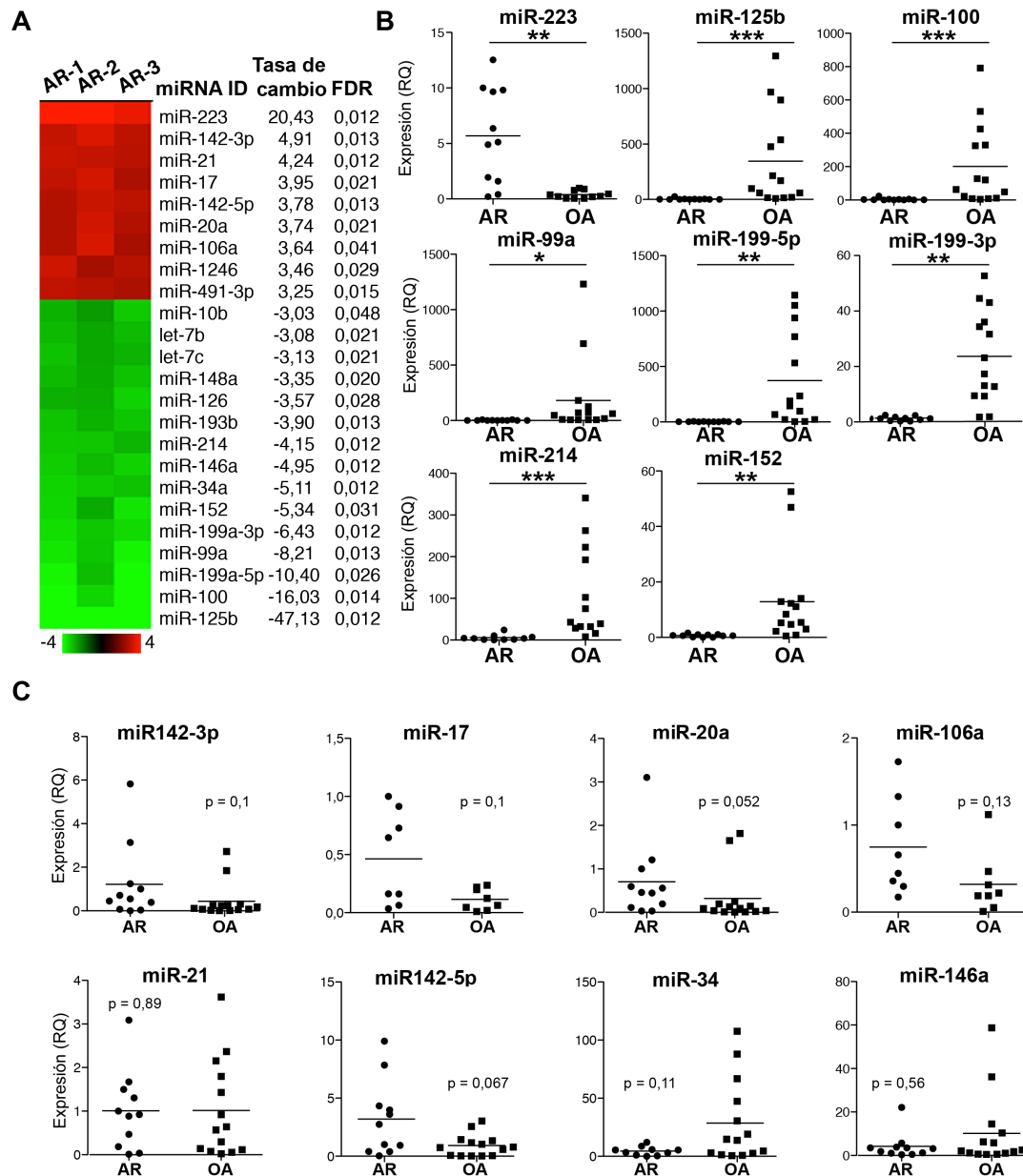


Fig. 8. Los MΦ de AR y OA difieren en la expresión de miRNAs. (A) Representación *heat map* con los miRNAs diferencialmente expresados a partir de los datos de *microarray* en AR frente a OA (n=3). (B, C) Validación por RT-qPCR en una cohorte independiente de los miRNAs identificados como diferencialmente expresados en A. Los datos se expresan como cantidad relativa (RQ) para cada miRNA; los miRNAs validados se muestran en B, y los no validados en C. Cada punto representa el valor de un paciente individual, y el valor medio es indicado por la línea horizontal, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 *Mann-Whitney U-Test*.

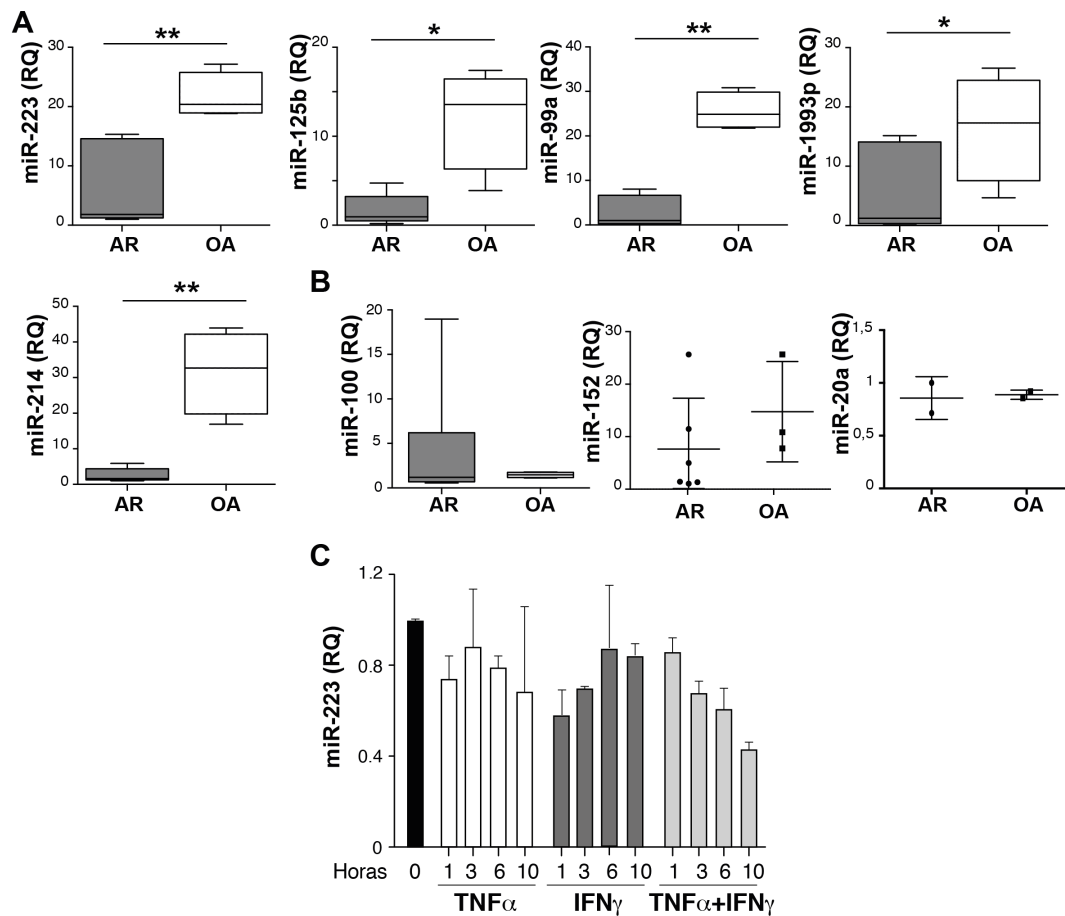


Fig. 9. Las citoquinas proinflamatorias no regulan los niveles del miR-223. (A,B) Expresión relativa (RQ) por RT-qPCR de los miRNAs indicados en M Φ derivados de monocitos de individuos sanos incubados con líquido sinovial de pacientes de AR (n=6) y de OA (n=4), (para miR-152 y miR-20a cada punto representa el valor de muestras individuales). Valores medios \pm máx-mín., **p<0,01 *p<0,05 *Mann-Whitney U-Test*. **(C)** Expresión relativa del miR-223 en monocitos de donantes sanos estimulados con TNF α , IFN γ o la combinación de ambos, a los tiempos indicados. Los datos son la media \pm SEM de triplicados (n=2); los datos no fueron diferentes significativamente con Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post-test para comparaciones múltiples.

1.3 La vía de señalización de Notch es menos funcional en pacientes con AR.

Se quiso conocer los factores de transcripción (FT) que pudieran estar regulando positivamente la expresión del miR-223 en los M Φ de AR. Se usó la plataforma ENCODE para identificar las posibles regiones de unión de FT en 10KB *aguas arriba* de la secuencia del miR-223; con la base de datos Ensembl se identificaron 5 posibles FT reguladores del miR-223 (Tabla 9). Entre los FT predichos, el factor de respuesta a suero (SRF), el *early growth response 1* (EGR1) y el factor asociado a la unión de la caja TATA (TAF1) regulan procesos celulares muy variados. PU.1 es un FT conocido en

hematopoyesis, que regula positivamente miR-223⁵⁶. Sin embargo, el factor HEY-1 no se ha relacionado con miR-223 y se induce muy específicamente por la vía de señalización de Notch, lo cual permite acotar la posible regulación.

Tabla 9. Factores de transcripción predeterminados para la unión al promotor del miR223.

Factor de Transcripción	Localización	Tipo celular
SRF	66017174-66017482	GM12878
PU1	66018575-66019006	GM12878
EGR1	66009236-66009546	K562
TAF1	66015066-66015773	K562
HEY-1	66015169-66019731	K562
PU1	66018574-66018961	K562

El análisis de la vía Notch en MΦ sinoviales indicó un menor nivel de expresión de mRNA para dos dianas de Notch, HEY-1 y HES-1 en AR respecto a OA (Fig. 10A). Siendo HEY-1 y HES-1 dianas inducidas por Notch, se usó la *Molecular Signatures Database* (MSigDB) para conocer la implicación del resto de dianas de genes regulados por Notch establecidos y usados en publicaciones anteriores^{191,192} (materiales y métodos Tabla 4), mediante un análisis de *gene set enrichment analysis* (GSEA). Utilizando los datos de células CD14⁺ de líquido sinovial en AR y de tejido en OA (GSE27390)¹⁸³, se observó una menor señalización de la vía de Notch en AR comparado con OA (FDR<0,05) (Fig.10B). Comparando *bone marrow-derived cells* (BMDC) de pacientes de AR y de OA (GSE27390)¹⁸², también se percibió una tendencia negativa de señalización de Notch en pacientes de AR (FDR=0,28. Fig. 10C).

A continuación analizamos si habría cambios en niveles de los receptores Notch, que justificaran la disminución de la expresión de HES-1 y HEY-1 observado en los MΦ de AR (Fig. 10A). En células CD14⁺ de AR se detectaron niveles de mRNA más bajos de la isoforma 3 del receptor de Notch comparado con las células derivadas de OA; los valores relativos del resto de isoformas Notch1, Notch2 y Notch4 no fueron estadísticamente diferentes para ambas patologías (Fig. 11). Así, la menor expresión del Notch3 apoya, junto con el análisis GSEA, la idea de que la vía Notch es menos activa en los MΦ de AR.

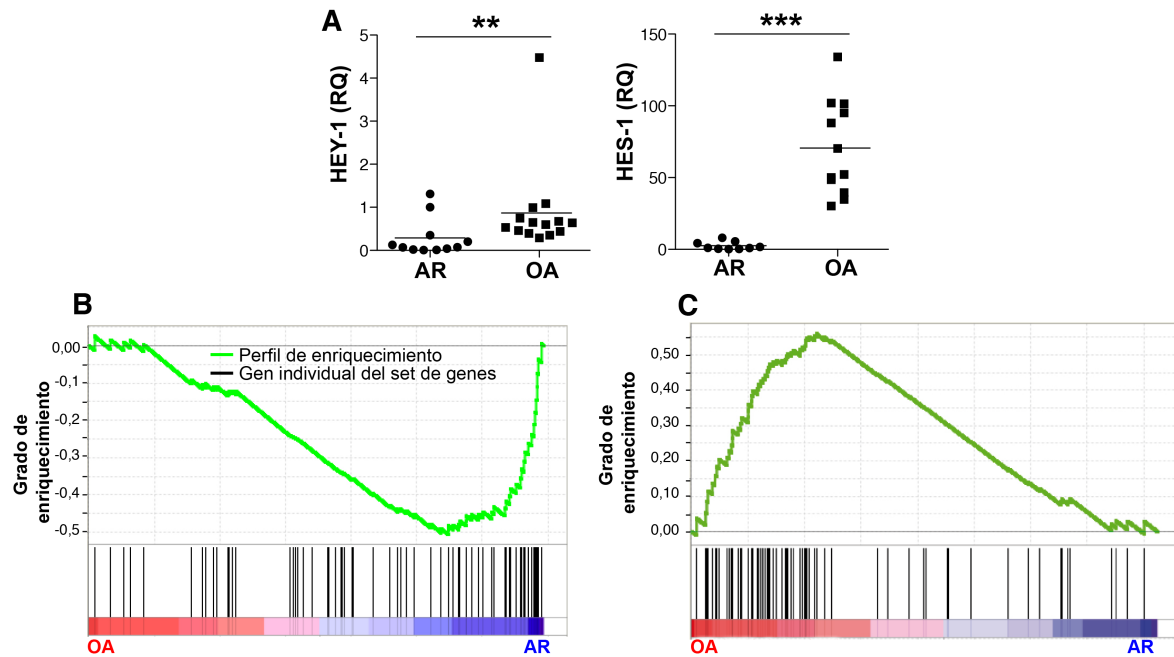


Fig. 10. La vía de Notch está inhibida en AR. (A) Expresión relativa (RQ) por RT-qPCR del mRNA de HEY-1 y HES-1 en células CD14⁺ de pacientes de AR y OA. (B) Curva de enriquecimiento (*Enrichment plot*) obtenida tras la comparación de los perfiles de expresión de MΦ de líquido sinovial de AR (n=3) y tejido sinovial de OA (n=3) mediante GSEA (GSE49604), en la que se observa la regulación negativa de genes de la vía de Notch. (C) Análisis por GSEA de los perfiles de mRNA de BMDC de AR (n=9) y OA (n=10) en la que se observa el enriquecimiento de genes de la vía de Notch en OA (GSE27390). Set de genes utilizado "GSI_Notch". A, Cada punto representa el valor de un paciente; el promedio es indicado por la línea horizontal. ***p<0,001, **p<0,01 *Mann-Whitney U-Test*.

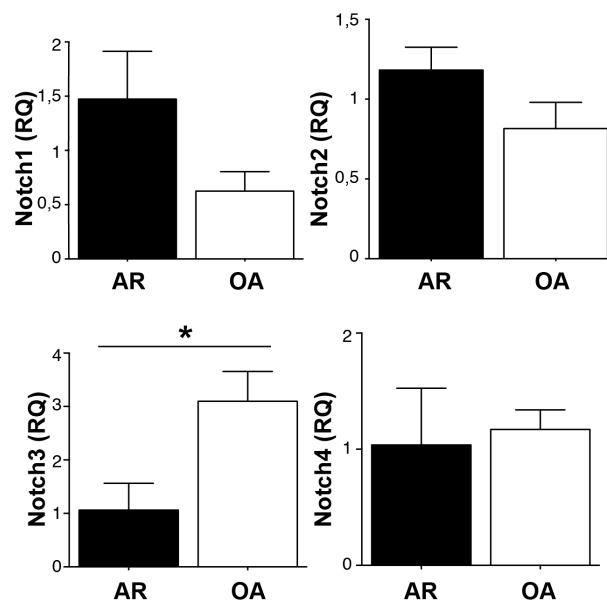


Fig. 11. Los niveles de Notch3 están regulados negativamente específicamente en MΦ de AR. Expresión relativa (RQ) por RT-qPCR de las diferentes isoformas de Notch en células CD14⁺ de pacientes de AR (n=4) y OA (n=6). Los datos son media±SEM, *p<0.05 *Mann-Whitney U-Test*.

1.4 La vía de señalización de Notch regula la expresión del miR-223

Sustentando la idea de que la vía de Notch podría regular los niveles del miR-223, encontramos que los niveles del mRNA de Notch3 correlacionaron negativamente con los del miR-223 (Fig. 12A) en células CD14⁺ aisladas de pacientes de AR. HEY-1 y HES-1 son factores de transcripción regulados por Notch que suelen actuar como represores de la transcripción de genes. La sobreexpresión de HEY-1 disminuyó los niveles del miR-223 en células HEK-293T. También se observó la misma tendencia sobre la cantidad relativa del miR-223 al sobreexpresar HES-1, aunque la variación no fue estadísticamente significativa (Fig. 12B).

Para vincular directamente Notch con los niveles del miR-223, se cocultivaron monocitos de sangre periférica de donantes sanos con células OP-9, que sobreexpresaban los ligandos humanos de Notch Jagged1, Jagged2, DLL1 y DLL4, ya que de forma endógena no los expresan. El cocultivo en *transwell* evitó el contacto celular, no observándose cambios de expresión del miR-223 en los monocitos humanos. Cuando se permitió el contacto con células OP-9 que expresaban JAG2, DLL1 o DLL4 se redujeron los niveles del miR-223 en los monocitos; el ligando JAG1 tendió a regular negativamente los niveles del miR-223, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El cocultivo también se realizó en presencia del inhibidor de la gamma-secretasa (DAPT), el cual bloquea la señalización de Notch¹⁹³. El DAPT logró revertir el efecto inhibitorio de Notch, observándose un incremento significativo de los niveles del miR-223 en los monocitos humanos pese al contacto con los ligandos de Notch. No fue estadísticamente significativa la variación del miR-223 en el cocultivo de OP-9 con o sin expresión de ligandos de Notch (Fig. 12C). Estos datos indican que la señalización de Notch reprime la expresión del miR-223 en MΦ de tejidos de pacientes y en monocitos de sangre periférica.

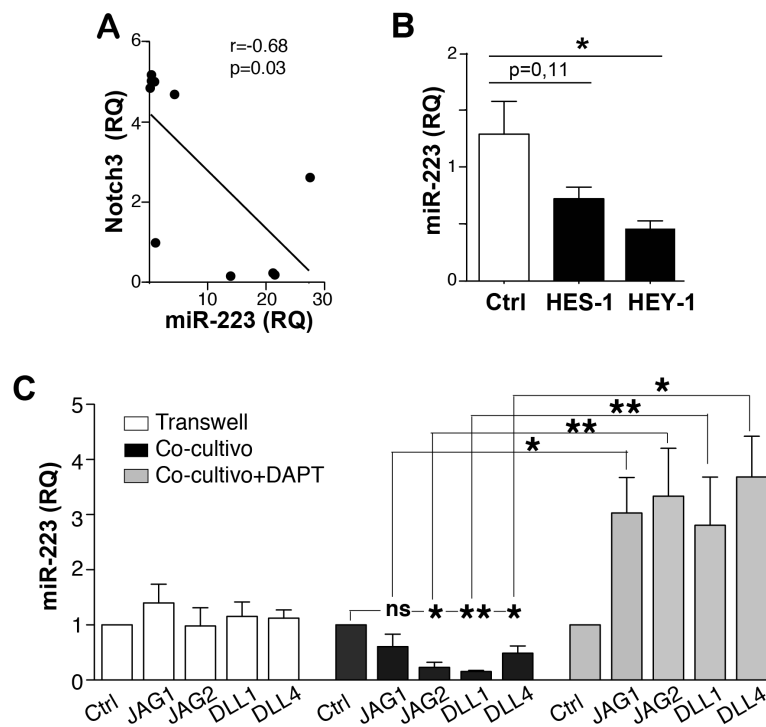


Fig. 12. La vía de señalización de Notch gobierna los niveles del miR-223. (A) Regresión lineal pareada de los niveles relativos de Notch3 y miR-223 en células CD14⁺ de pacientes de AR y OA (n=11). (B) Expresión relativa del miR-223 por RT-qPCR en células HEK-293T transfectadas con HES-1, HEY-1 o cDNA control (n=3). (C) Expresión relativa del miR-223 por RT-qPCR en monocitos de donantes sanos cultivados con células OP-9 control o células OP-9 expresando los ligandos de Notch indicados en condiciones que permitían el contacto célula-célula (co-cultivo; barras negras) o que no lo permitía (*transwell*; barras blancas). El co-cultivo de monocitos y células OP-9 también se realizó en presencia del inhibidor de Notch DAPT (barras grises) en condiciones de contacto célula-célula. B,C, los datos son media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post-test para comparaciones múltiples.

1.5 Búsqueda de dianas del miR-223.

En monocitos o macrófagos, el miR-223 es capaz de atenuar al IKK α ⁶⁴. Reducir los niveles del IKK α podría tener un efecto positivo en la producción de elementos proinflamatorios al inhibir la vía canónica de NF- κ B, conocida por la producción de citoquinas. Al analizar los niveles de mRNA de IKK α en M Φ de AR no se detectaron diferencias entre las muestras de AR y OA (Fig. 13A). Mediante inmunohistoquímica se apreció que la proteína IKK α presentaba una tinción similar en la membrana sinovial de pacientes de AR y OA (Fig. 13B). Estos datos indican que en macrófagos de AR el miR-223 no estaría afectando a los niveles de IKK α .

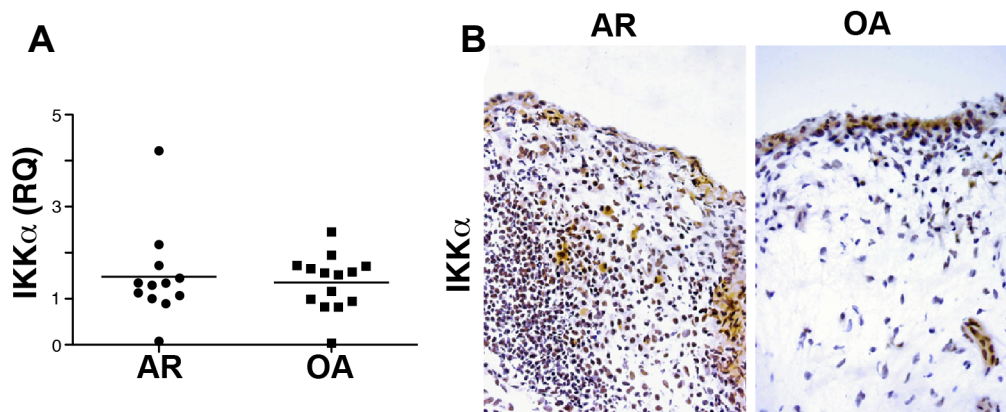


Fig. 13. Los niveles de IKKα son comparables en el tejido sinovial de pacientes con AR y OA. (A) Expresión relativa de IKKα (RQ) por RT-qPCR en células CD14⁺ aisladas de pacientes con AR y OA. Cada punto representa el valor de un paciente. Las diferencias no fueron significativas con *Mann-Whitney U-Test*. (B) Tinción representativa para IKKα en tejidos sinoviales de AR (n=13) y OA (n=8).

Aunque los miRNAs pueden actuar potenciando rutas de señalización, lo habitual es que las repriman. Dianas descritas del miR-223, como NLRP3, PKNOX1 y STAT3^{61,63,62} actúan favoreciendo la inflamación. El aumento de los niveles del miR-223 en los MΦ de AR bloquearía estas rutas inflamatorias. Esto es contrario a lo que ocurre en los tejidos de los pacientes y a la hipótesis planteada. Por eso, se quiso comprobar otras posibles dianas del miR-223. Abordamos la búsqueda con un análisis *in silico*. La herramienta *Ingenuity pathway analysis* (IPA) mostró 25 vías de señalización como posibles dianas del miR-223 (Fig. 14), entre las que cabe señalar la vía del AhR, la integrin-linked kinase (ILK), la PPAR-α/retinoid X receptor (RXR)-α, y las *small Rho GTPases*. Nos centramos en la vía del AhR por su implicación en AR¹⁰⁴. Dentro de la vía del AhR, el análisis IPA identificó como dianas del miR-223 confirmadas experimentalmente a NF1A, E2F1 y NF1X^{58,194}. Otra de las dianas predichas no experimental fue ARNT (el translocador nuclear del AhR), el cual es un elemento esencial para la activación transcripcional del AhR. ARNT cuenta con 12 transcritos según Ensembl, de los cuales, 6 presentan región 3'-UTR. FindTar predijo 4 y 6 lugares de unión a esta región 3'-UTR para las formas 3p y 5p del miR-223, respectivamente (Tabla 10).

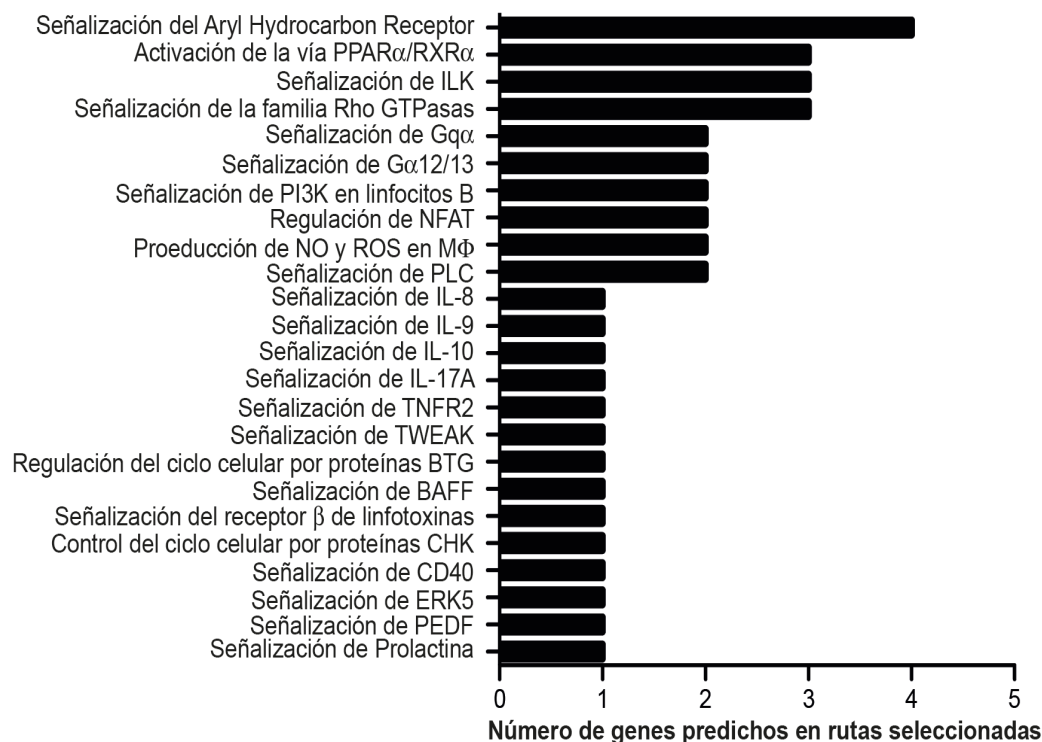


Fig. 14. Dianas predichas para miR-223 identificadas por *Ingenuity pathway analysis*. Se indica el número de genes diana predichos para cada vía de señalización.

Tabla 10. Predicción de la unión entre la región 3'-UTR de ARNT y los miR-223-3p y 5p.

miRNA	Identidad tránsito ENSEMBL	Detalles		Algoritmo de predicción
		(Longitud/número de oscilaciones/)	Posición en 3'-UTR	
hsa-miR-223-3p	ENST00000354396	6/0/	1141-1146	FindTar
	ENST00000358595			
	ENST00000471844	6/1/	1526-1531	
			79-84	
	ENST00000504358		243-248	
hsa-miR-223-5p	ENST00000354396	7/1/	761-767	
	ENST00000358595			
	ENST00000471844		1146-1152	
	ENST00000354396	8/1/	778-785	
	ENST00000358595			
	ENST00000471844		1163-1170	
	ENST00000358595	6/1/	2096-2101	

Se usó ClustalW v2.1 para el alineamiento entre el miR-223 y el 3'-UTR.

1.6 miR-223 regula la traducción de la proteína ARNT.

Para determinar si la región 3'-UTR de ARNT es una diana del miR-223, se transdujeron células HEK-293T con el pre-miR-223 o con un miRNA control, y con un plásmido que contiene la secuencia 3'-UTR de ARNT fusionado al gen de la luciferasa bajo el control del promotor de citomegalovirus. Como control positivo de silenciamiento se usó un plásmido con la 3'-UTR de IKK α , diana experimental del miR-223. La expresión del miR-223 redujo la actividad luciferasa asociada al 3'-UTR de IKK α y ARNT comparado con el miRNA control (Fig. 15A).

La sobreexpresión del miR-223 en las células mieloides THP-1 (Fig. 15B) no afectó a la cantidad de mRNA de ARNT (Fig. 15C,D) pero sí disminuyó los niveles de la proteína ARNT (Fig. 15E), lo que sugiere que el miR-223 actúa inhibiendo la traducción del mRNA de ARNT. La cantidad de mRNA y proteína del AhR se mantuvo invariable en esas condiciones de sobreexpresión (Fig. 15D, 15F).

La activación del AhR con el ligando BaP provoca el aumento del citocromo 1A1 (CYP1A1) en las células THP-1, efecto que se vio atenuado por la sobreexpresión del miR-223. (Fig. 15G). Los datos sugieren que en células mieloides los altos niveles del miR-223 bloquean la funcionalidad de la vía AhR/ARNT mediante la unión del miR-223 a la región 3'-UTR de ARNT y la reducción de los niveles de dicha proteína, sin afectar al receptor AhR.

1.7 miR-223 aumenta la producción de citoquinas inhibiendo la vía del AhR.

Los agonistas del AhR disminuyen la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 β en respuesta a LPS^{114,115,118}; dichas citoquinas tienen un papel clave en el desarrollo y patogenia de la AR. Cuantificamos estas citoquinas en células THP-1 control o THP-1 que sobreexpresaban el miR-223, estimuladas con LPS y/o BaP, un inductor de la vía del AhR (Fig. 16). LPS indujo la expresión de estas citoquinas y la sobreexpresión del miR-223 potenció la inducción de IL-6 por LPS; la misma tendencia se observó para el TNF α . Cuando se activó la vía del AhR con BaP, se inhibió significativamente la inducción de TNF α , IL-6 e IL-1 β por LPS, validando la capacidad del AhR para disminuir la expresión de citoquinas. La inhibición de citoquinas proinflamatorias fue parcialmente revertida por la sobreexpresión del miR-223, no alcanzándose el efecto reductor de citoquinas obtenido en las células control, y aunque BaP tuvo cierta influencia, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se observó un incremento para TNF α , IL-6 e IL-1 β en células THP-1 que sobreexpresan

miR-223 comparado con la situación control en presencia de LPS+BAP (Fig. 16). Los niveles altos del miR-223 podrían potenciar la producción de citoquinas proinflamatorias, bloqueando el efecto inhibitorio de la vía AhR.

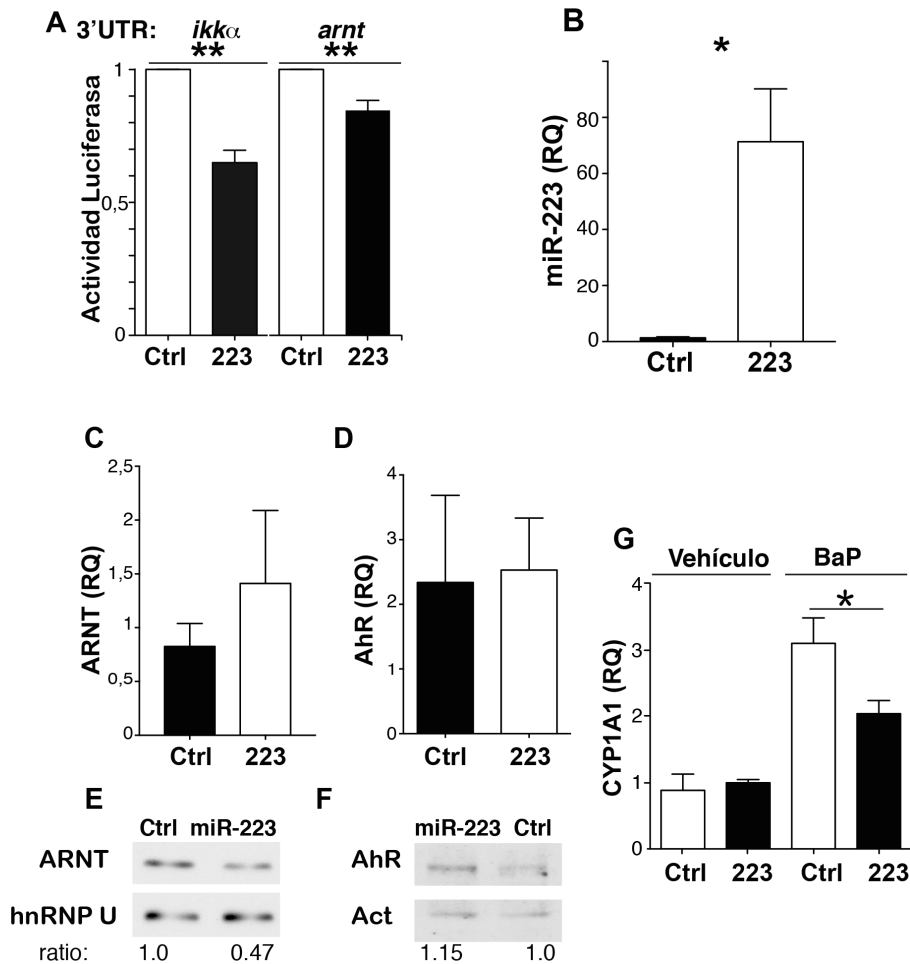


Fig. 15. miR-223 regula negativamente la vía del AHR disminuyendo la traducción del co-receptor ARNT. (A) Cantidad relativa de actividad luciferasa en células HEK-293T transducidas con miR-223 o control (n=3). Valores de renilla de células control tomados como referencia. (B) Expresión relativa del miR-223 (RQ) en células THP-1 transducidas con pre-miR-223 o control (Ctrl) (n=2). (C, D) Expresión relativa de ARNT (C, p=0,2) y AhR (D) en células THP-1 transducidas con pre-miR-223 o control. Los datos son media±SEM de triplicados (n=3). (E, F) *Inmunoblot* representativo de tres experimentos independientes mostrando los niveles de ARNT, AhR, hnRNP U (control de carga nuclear) y β-Actina (control de carga citosólico y nuclear) en los lisados de células HEK-293T transducidas con miR-223 o control. El ratio hnRNP U/ARNT o β-Actina/AhR se indica en cada carril. (G) Expresión relativa de mRNA de CYP1A1 en células THP-1 con sobreexpresión del miR-223 o control tratadas con BaP o vehículo (n=3). En todos los casos, los datos son media ±SEM. A,B,C,D,G *p<0,05 **p<0,01 Mann-Whitney U-Test.

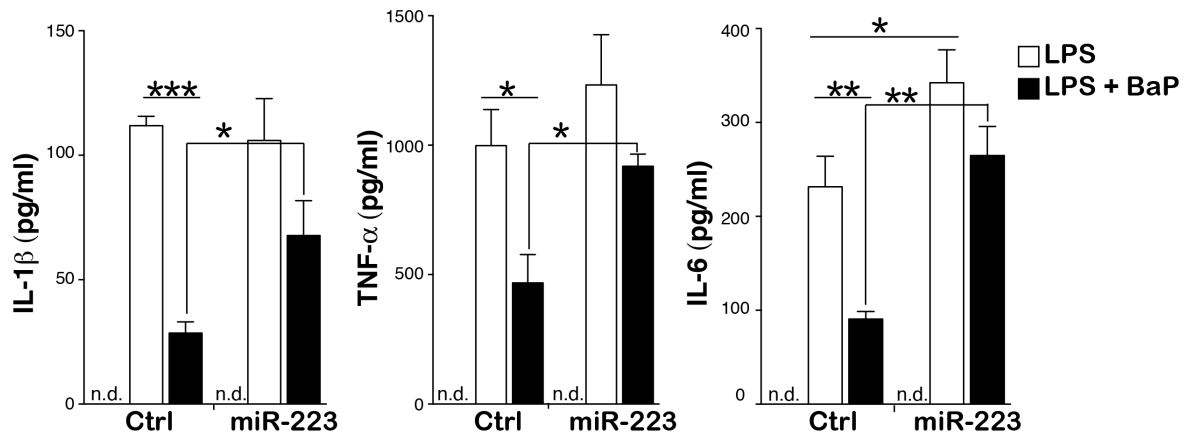


Fig. 16. miR-223 disminuye la capacidad antiinflamatoria del AhR. Análisis de los niveles de IL-1 β , TNF α e IL-6 medidos por ELISA en el sobrenadante de células THP-1 control o sobreexpresando miR-223, en presencia de vehículo, LPS o LPS+BaP. La concentración de las citoquinas se normalizó por mg de extracto celular. Los datos son la media \pm SEM de triplicados en tres experimentos independientes, ***p<0,001 **p<0,01 *p<0,05 Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post-test Para el vehículo los niveles de citoquinas no fueron detectados (n.d.).

1.8 Atenuación de la vía del AhR en el tejido sinovial de pacientes de AR.

Analizamos si los niveles del miR-223, elevados en pacientes con AR, están relacionados con la funcionalidad de la vía AhR/ARNT en estos pacientes. Para ello, se determinó el patrón de expresión de CYP1B1, marcador de actividad de la vía AhR, en secciones de tejido sinovial de pacientes de AR y de OA, en combinación con el marcador de M Φ CD68 $^{+}$. Aunque CYP1B1 se expresó también en células CD68 $^{-}$, encontramos un mayor porcentaje de macrófagos con niveles bajos o indetectables de CYP1B1 en las muestras de AR que en OA (Fig. 17A), indicando una menor actividad de la vía del AhR en dichas células. Mediante inmunohistoquímica en tejido sinovial, observamos que CYP1B1 mostró un patrón citoplásmico abundante en fibroblastos y células grandes mononucleares en tejidos de AR y OA. El área teñida con CYP1B1 fue mayor en tejidos de OA que en AR, lo que se correlacionaba con la acumulación de células ARNT $^{+}$ en dichas regiones (Fig. 17B). Los datos sugieren una atenuación de la vía AhR en los tejidos sinoviales de pacientes aquejados de AR.

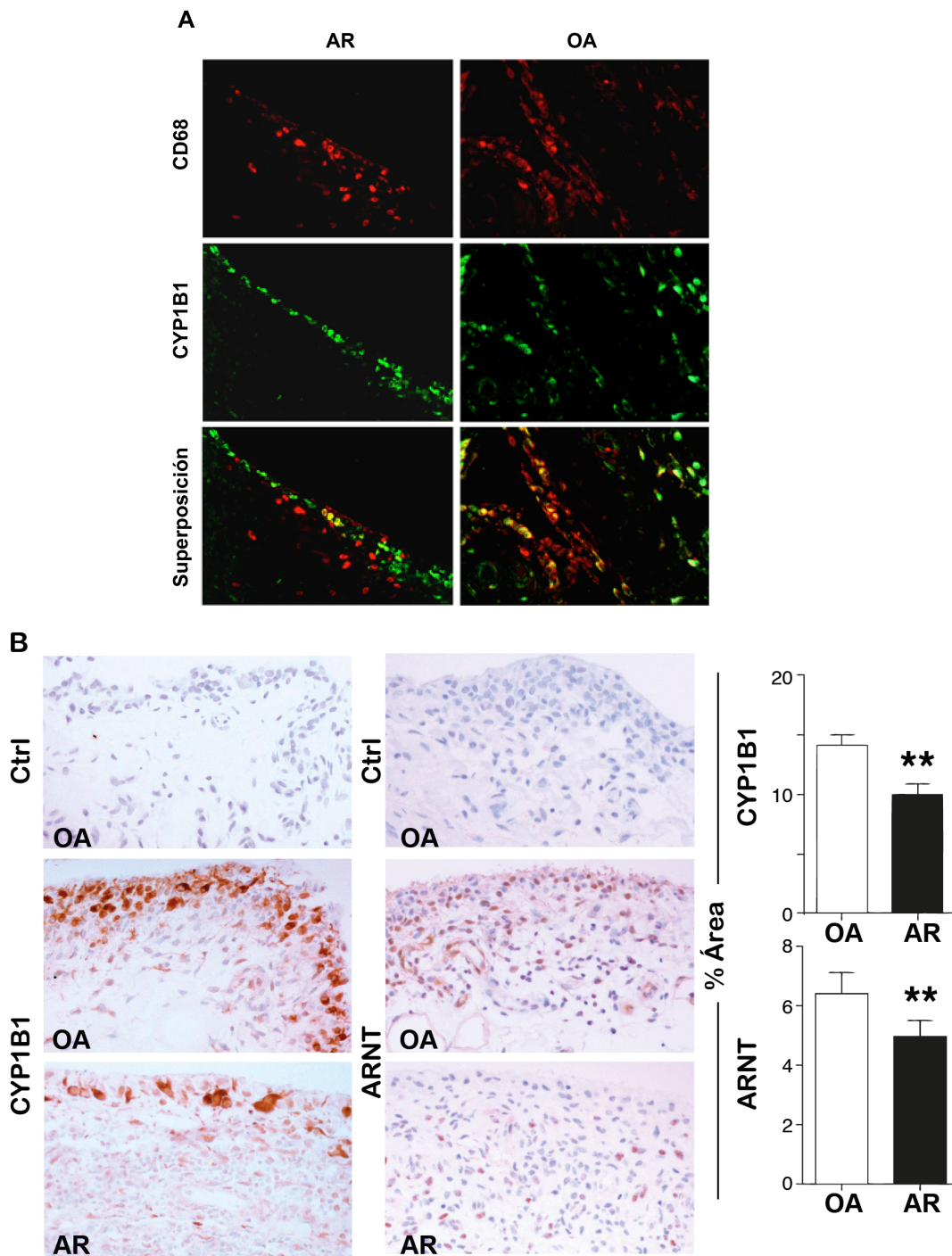


Fig. 17. La expresión de CYP1B1 y ARNT está disminuida en tejido sinovial de AR. (A) Tinción de tejido sinovial de pacientes de OA y AR para CYP1B1 (verde) y CD68 (rojo; marcador de MΦ); la colocalización de ambos marcadores es indicada por el color amarillo. Imágenes representativas de 5 cortes de tejido por condición. (B) Análisis por inmunohistoquímica de los niveles de CYP1B y ARNT en tejidos de pacientes de AR (n=13) y OA (n=8). IgG como control (Ctrl). A la derecha se indican los valores (media \pm SEM) del porcentaje del área teñida de cada marcador determinada usando ImageJ **p<0,01 Mann-Whitney U-Test.

Se comprobó, por qPCR, la expresión de los marcadores de actividad del AhR (CYP1A1, CYP1B1 y CYP1A2) en células CD14⁺ purificadas de pacientes de AR y OA. Su análisis reveló una menor expresión para CYP1A1 y CYP1B1 en pacientes de AR (Fig. 18A). Además, se halló una correlación negativa entre los niveles del miR-223 en MΦ y los niveles de CYP1A1 y CYP1B1 (Fig. 18B). No se detectó expresión de CYP1A2 en dichos análisis.

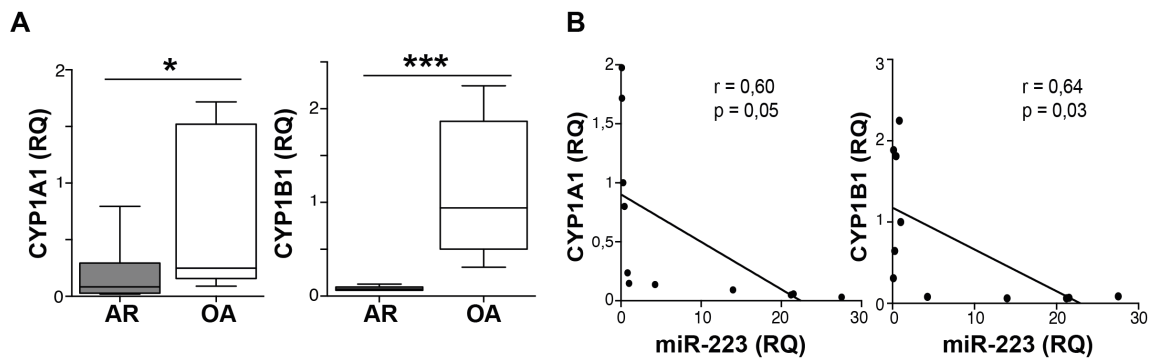


Fig. 18. La expresión de citocromos está disminuida en los MΦ de AR, y correlaciona negativamente con los niveles de miR223. (A) Expresión relativa de CYP1A1 y CYP1B1 en células CD14⁺ aisladas de pacientes de AR (n=6) y OA (n=8). Valores medios \pm máx-mín; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ Mann-Whitney U-Test. **(B)** Regresión lineal pareada de los niveles relativos de CYP1A1 y CYP1B1 y los niveles del miR-223 en pacientes de AR y OA (n=11); cada punto representa un paciente.

De nuevo recurrimos a datos depositados en bases públicas para determinar mediante GSEA si las observaciones obtenidas en nuestra cohorte coincidían con observaciones independientes. Se generó un set de genes asociado a AhR (Materiales y métodos, Tabla 5) y con él se analizaron los perfiles de expresión de MΦ procedentes de líquido sinovial (GSE49604) y de células mononucleares derivadas de médula ósea (GSE27390; BMMC) de pacientes con AR y con OA. GSEA demostró que la vía del AhR está enriquecida en células derivadas de pacientes con OA respecto de AR (Fig. 19A, B), aunque dicho enriquecimiento solo alcanzó significación estadística en el análisis con BMDC ($p < 0,25$); los datos procedentes de MΦ sinoviales mostraron una tendencia ($p = 0,1$) en el mismo sentido. El análisis no fue sesgado al no encontrarse diferencias de expresión para AhR en MΦ de AR (Fig. 19C). Por lo tanto, el conjunto de evidencias indican una menor actividad de la vía AhR en AR comparado con OA.

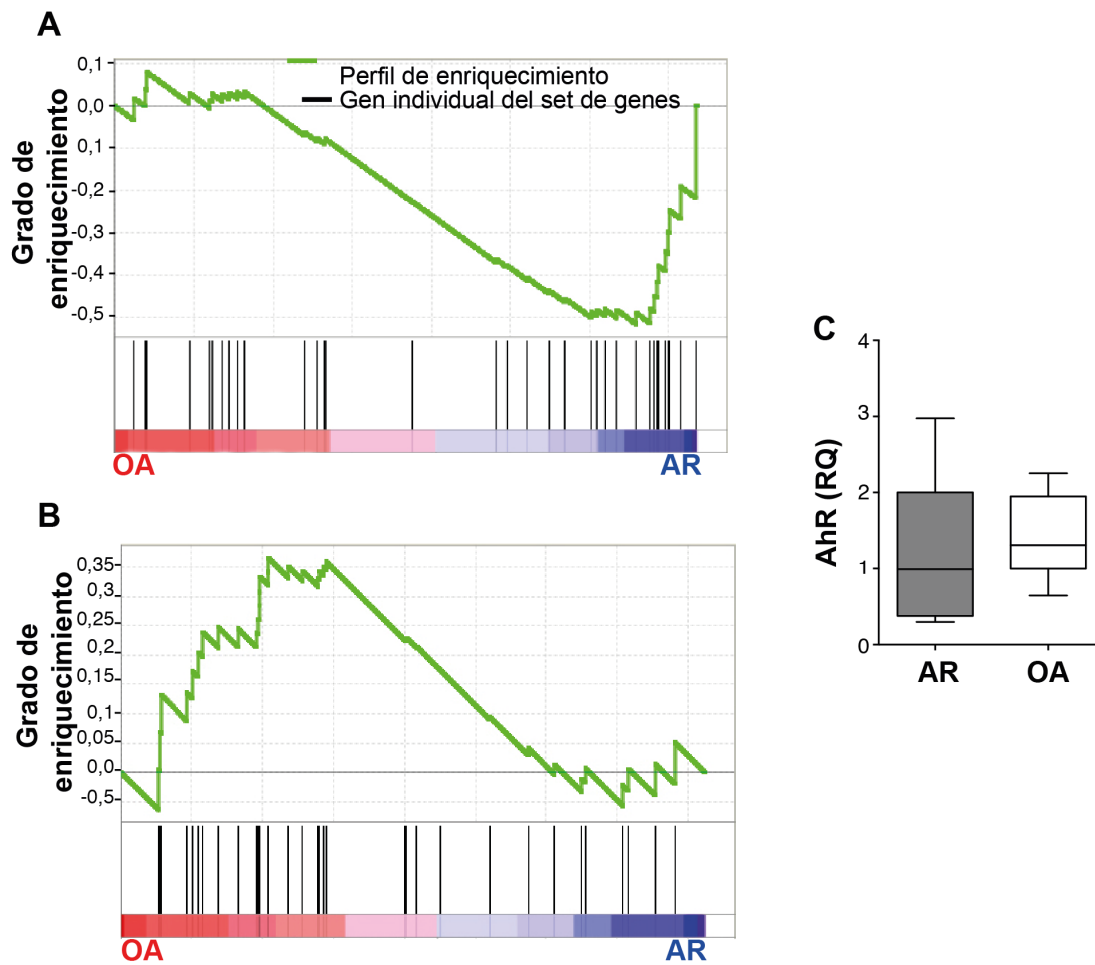


Fig. 19. La vía AhR/ARNT es menos funcional en pacientes de AR. (A) Curva de enriquecimiento de genes de la vía del AhR obtenida a partir de los perfiles de mRNA (GSE27390) de MΦ aislados de líquido sinovial de AR (n=3) y tejido sinovial de OA (n=3) mediante GSEA, usando el AhR geneset indicado en la Tabla 4. (B) Análisis por GSEA de los perfiles de mRNA de BMDC de AR (n=9) y OA (n=10) (GSE27390) para mostrar el enriquecimiento de la vía del AhR en las células derivadas de pacientes con OA. (C) Expresión relativa del mRNA del AhR en células CD14⁺ aisladas de pacientes de AR (n=7) y OA (n=7) en nuestra cohorte. Valores medios \pm máx-mín; las diferencias no fueron significativas con *Mann-Whitney U-Test*.

1.9 miR-223 regula los niveles de Notch vía AhR/ARNT.

La vía del AhR es capaz de inducir la expresión de Notch en células inmunes del sistema innato en hígado e intestino¹⁹⁵. Dada la correlación negativa entre los niveles del receptor Notch3 y del miR-223 en los MΦ de AR en nuestra cohorte, quisimos vincular la sobre-expresión del miR-223 con la disminución de la vía del AhR y los niveles de Notch3 en células mieloides.

Células THP-1 transfectadas con pre-miR-223 o con un miRNA control se estimularon con BaP. La activación del AhR con BaP provocó la inducción de Notch3 únicamente en las células que expresaban el miRNA control, no así en las que sobreexpresaban el miR-223 (Fig. 20A). En las células CD14⁺ de los pacientes AR también se encontró una correlación positiva entre los niveles de mRNA de CYP1A1, CYP1B1 y Notch3 (Fig. 20B). Atendiendo a los resultados anteriores se propone un modelo en el que los niveles elevados del miR-223 en macrófagos de pacientes de AR son debidos a la menor señalización de Notch y propician la inhibición de la vía AhR mediante la disminución en la síntesis de ARNT. Este hecho implicaría la reducción de niveles de Notch3 y la mayor expresión de citoquinas proinflamatorias, creándose un *bucle* de retroalimentación positiva para aumentar los niveles del miR-223.

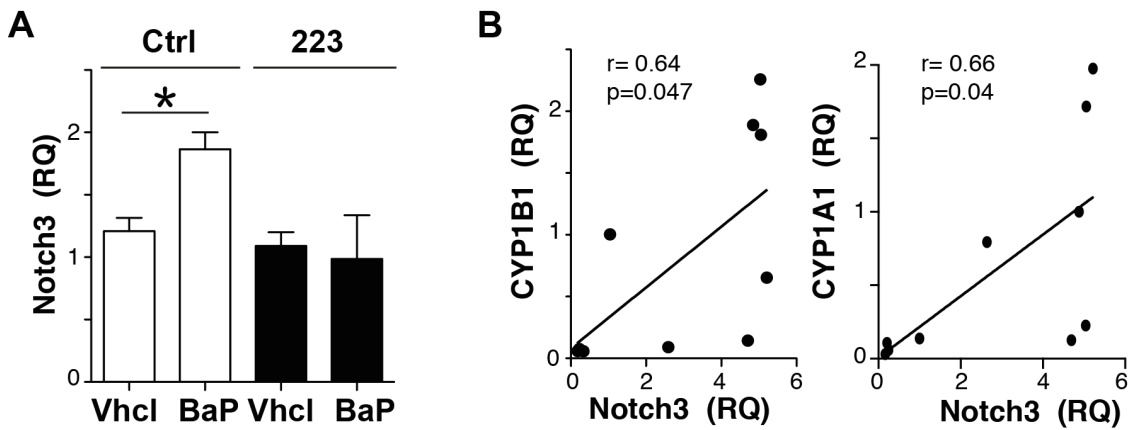


Fig. 20. miR-223 bloquea la inducción de Notch3 por la vía AhR/ARNT. (A) Expresión relativa de los niveles de Notch3 en células THP-1 tratadas con vehículo control (Vhcl) o con BaP. Los datos se muestran como la media±SEM de los resultados obtenidos de tres experimentos independientes; * $p < 0.05$ Mann-Whitney U-Test. (B) Regresión lineal pareada de los niveles relativos de CYP1A1 y CYP1B1 enfrentada a los niveles de Notch3 en pacientes de AR y OA ($n=10$); cada punto representa un paciente.

2. Análisis de las señales inducidas por PD-1 en linfocitos T CD8 humanos.

2.1 Generación de un modelo *ex vivo* de señalización mediada por PD-1.

Para conocer la señalización producida por PD-1 en linfocitos T CD8⁺ en respuesta a sus ligandos, se estableció un modelo *ex vivo* que mimetiza su activación fisiológica utilizando un estímulo policlonal del TCR, un estímulo de coestimulación y la adición simultánea del ligando PD-L1 revestidos en esferas magnéticas definidas como células presentadoras de antígeno artificiales (aAPCs)^{196,197}; este sistema fue previamente descrito y utilizado para la activación de células CD4⁺ humanas¹⁹⁸.

Para disponer de linfocitos humanos CD8⁺ purificados (hCD8⁺) se utilizó sangre humana concentrada procedente de bancos de donantes sanos. Los linfocitos T CD8⁺ se purificaron por selección negativa utilizando esferas magnéticas (Fig. 21A). Se observó una alta variabilidad en el porcentaje de células hCD8⁺ presentes en las muestras de sangre inicial, entre un 17,6 y un 51% (Fig. 21B). Se obtuvo un alto grado de enriquecimiento, 86-95,5% del total de la muestra, que nos permite determinar la respuesta específica de este tipo celular en tres condiciones de estimulación. En la condición que se denominará activadas (en adelante, ACT), las células se cultivaron con aAPCs en forma de esferas magnéticas revestidas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (estimulación del TCR) y anti-CD28 (señal coestimuladora)¹⁹⁹. Para inducir la estimulación de PD-1, se utilizaron aAPCs revestidas con anti-CD3/anti-CD28 y con la proteína de fusión PD-L1-IgG (en adelante, condición ACT+PD-L1); como control negativo se usaron aAPCs recubiertas de inmunoglobulina G (condición IgG). Así, durante el desarrollo de este apartado se hablará de cultivos de linfocitos T hCD8⁺ IgG, ACT y ACT+PD-L1.

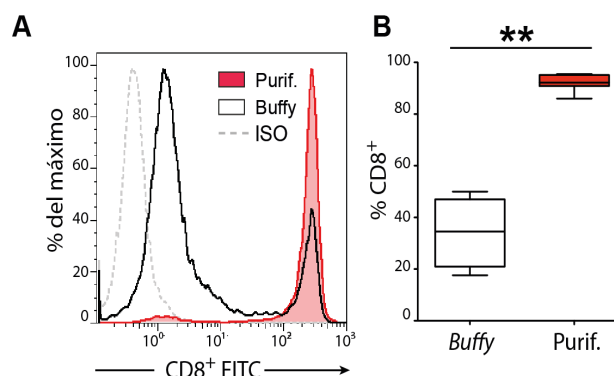


Fig. 21. Purificación de células CD8⁺. (A) Análisis por FACS de células CD8 en la preparación inicial de sangre concentrada (*Buffy*), y tras el enriquecimiento por selección negativa (*Purif.*). La tinción con un anticuerpo isotópico no específico se representa en línea discontinua. Se muestra un donante representativo. (B) Porcentaje total de células CD8⁺ de la muestra inicial y enriquecida tras la purificación. Valores medios \pm max-min (n=4), **p<0.01 *Mann-Whitney U-Test*.

Caracterizamos el estado de activación de los linfocitos T hCD8⁺ para validar el modelo de estimulación *ex vivo*. Se analizó la expresión de marcadores de activación, tanto tempranos (CD69) como tardíos (CD25) (Fig. 22B), la expresión del PD-1 (CD279) (Fig. 22D), así como la proliferación celular (Fig. 22E) y la producción de IFN γ (Fig. 22C) indicadores todos ellos de una correcta activación linfocítica^{200,201}. Comparado con el control negativo, las hCD8⁺ respondieron a los estímulos de las aAPC en la condición de ACT, viendo inducidos durante las primeras horas de coestimulación del TCR los marcadores de activación (CD25 o CD69), IFN γ y CD279; además proliferaron en respuesta al estímulo (Fig. 22). Las células hCD8⁺ ACT+PD-L1 mostraron una significativa menor expresión de CD25, CD69, y menor producción de IFN γ (Fig. 22A,B,C). El PD-L1, no es capaz de bloquear toda la señal que genera CD3/CD28, puesto que CD69 se encuentra significativamente más inducido si se compara con la condición IgG (Fig. 22B). La unión del PD-L1 con su receptor también inhibió la proliferación celular (Fig. 22E). Por lo tanto, los datos fueron consistentes con los conocidos efectos ante los estímulos ACT+PD-L1²⁰². Los datos obtenidos validan nuestro modelo para el estudio de la vía de señalización PD-1/PD-L1.

2.2 Análisis de la expresión diferencial de microRNAs y mRNA mediada por PD-1 en linfocitos hCD8⁺.

Con el objetivo de identificar genes con patrón de expresión específico asociado a la activación de la vía PD-1/PD-L1, las células hCD8⁺ procedentes de tres donantes independientes se juntaron y se sometieron a las condiciones IgG, ACT y ACT+PD-L1 durante diferentes tiempos en tres réplicas experimentales independientes (n=9 donantes por condición/tiempo). Tras la estimulación con las diferentes aAPCs, se extrajo el ARN total y se realizó un estudio de la expresión de miRNAs, mediante un *array específico*, y de mRNA mediante secuenciación masiva (RNA-seq).

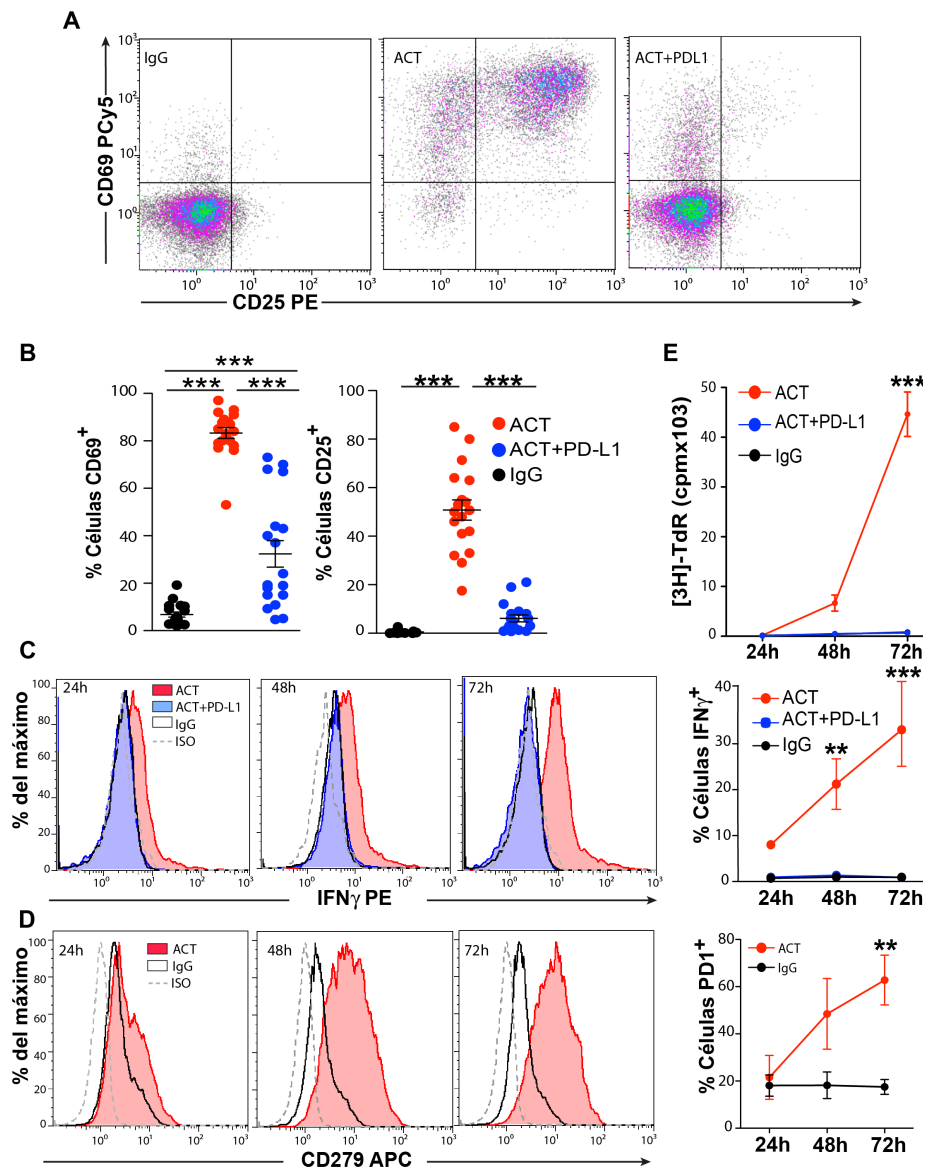


Fig. 22. Validación funcional de las aAPCs en células CD8⁺ humanas. Linfocitos CD8⁺ humanos enriquecidos por selección negativa se incubaron con aAPCs revestidas con anti-CD3/anti-CD28 (ACT), con anti-CD3/anti-CD28/Ig-PD-L1 (ACT+PD-L1) o con inmonoglobulina G (IgG). **(A)** Dot Plot representativo de la tinción de las células CD8⁺ con anti-CD69-PCy5 y anti-CD25-PE tras 48h de incubación con las aAPCs mencionadas anteriormente. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células CD8⁺ positivas para cada marcador en experimentos como en A (n=18); se indican los valores individuales para cada donante y la media \pm SEM. **(C)** Expresión de IFN γ en células CD8⁺ incubadas con las aAPCs durante 24, 48 y 72h; a la izquierda se muestran los histogramas de un donante representativo y a la derecha el porcentaje medio \pm SEM de células hCD8⁺ IFN γ ⁺ (n=4). **(D)** análisis de la expresión de CD279 como en C. En este caso no se incluyó el grupo estimulado con las aAPCs ACT+PD-L1, ya que la unión de Ig-PD-L1 interfería con la tinción del anticuerpo anti-CD279. Los datos son el porcentaje medio \pm SEM de células hCD8⁺ CD279⁺ (n=6) **(E)** Proliferación de las células hCD8⁺ estimuladas con las aAPCs durante 24, 48 y 72h, medida por la incorporación de timidina tritiada ([³H]-TdR) (n=5). **p<0.01, ***p<0.001, (B) *One-way ANOVA Bonferroni post test*, (C,D,E) *two-way ANOVA Bonferroni post test*.

2.2.1 La señalización del PD-1 no provoca cambios específicos en la expresión de miRNAs.

El ARN total de células hCD8⁺ se utilizó en un microRNA *array* para conocer la expresión diferencial de miRNAs entre las condiciones de IgG (6 y 48 horas), ACT y ACT+PD-L1 (6, 24 y 48 horas). Para la comparación múltiple de los datos de expresión de miRNAs se utilizó un filtro de FDR <0,05 y una tasa de cambio (TC) $\geq \pm 2$ veces. De esta manera, únicamente el miR-155-5p, un miRNA que se ha descrito clave en el desarrollo linfocítico²⁰³, se mostró sobreexpresado en ACT a 24 y 48h comparado con IgG (a 48h miR-155-5p TC=3,8; FDR=0,007), pero no así en ACT comparado con ACT+PD-L1 (miR-155-5p TC=2,037; FDR= 0,99) (Fig. 23A).

Al comparar ACT y ACT+PD-L1 no se detectó ningún microRNA con expresión diferencial. Comparando ACT frente a IgG a las 48h se apreciaron TC ligeramente mayores a 2 veces de inducción en varios miRNAs (miR-21-5p y mir-21-3p). mir-155-5p fue el miRNA cuya expresión más cambió en ACT+PD-L1 frente a IgG a las 48h, aunque no llegó a inducirse más de dos veces (TC=1,953). Comparando las condiciones IgG de 6h y 48h tampoco se detectaron cambios de expresión de miRNAs, lo cual indica que las células poseen la expresión de miRNAs propios de una situación sin estímulo (Fig. 23A). Se comprobó por qPCR la expresión del miR-223 en las diferentes condiciones, no obteniendo diferencias significativas, al igual que en el miRNA *array* (Fig. 23B).

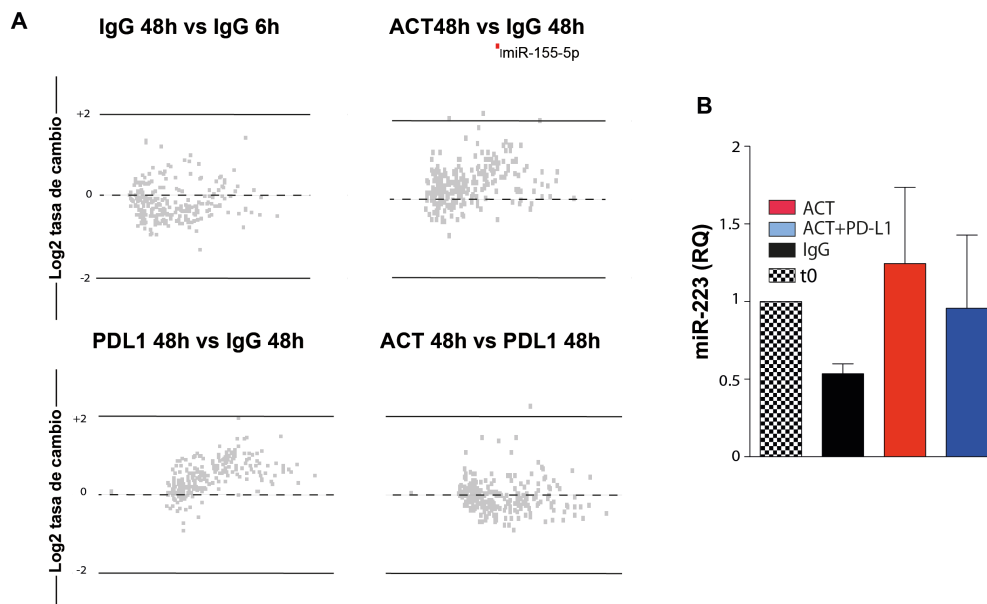


Fig. 23. PD-1 no induce cambio de expresión de miRNAs. (A) Diagramas MA de los datos obtenidos en miRNA *array* transformados a logaritmo binario de cambio entre muestras y la media normalizada de las cuentas obtenidas. El punto rojo representa el único miRNA diferencialmente expresado significativamente (FDR \leq 0.05) (n=9). **(B)** Expresión relativa del miR-223 tras 48h de estimulación con las aAPCs indicadas;

también se indica el nivel de expresión del miR-223 a 0h (t0). Los datos son media \pm SEM (n=3). Los datos no son estadísticamente significativos con test Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post test para comparaciones múltiples.

2.2.2 La señalización del PD-1 provoca cambios específicos en la expresión de mRNAs.

El ARN total de células hCD8⁺ se utilizó en un RNA-seq para conocer la expresión diferencial de genes entre las condiciones de IgG (6 horas), ACT y ACT+PD-L1 (6, 24 y 48 horas). Se quiso comprobar si las réplicas eran válidas para el análisis de expresión diferencial de ARN. Las muestras reflejaron una gran simetría en diagramas MA tras la normalización (Fig. 24), lo que indica que no existe un análisis sesgado de los resultados debido a las diferencias en la lectura de las moléculas de ARN.

La diferencia media entre las muestras fue estimada usando un análisis de distancia euclidiana (Fig. 25A). El gráfico muestra la existe poca variación de expresión de genes (colores más azules) entre la agrupación de donantes en tres réplicas independientes sometidos a los mismos estímulos. También se aprecia la similitud entre las condiciones IgG y ACT+PD-L1. Un análisis de componentes principales (PCA; Fig. 25B) mostró la asociación espacial entre las tres réplicas en cada condición del experimento, resultado que apoya la homogeneidad de las muestras. La uniformidad de expresión de los genes se apreció también mediante un agrupamiento jerárquico de los 200 genes más divergentes, puesto que las células hCD8⁺ de los tres donantes compartieron la mayoría de genes diferencialmente expresados en cada condición de IgG, ACT o ACT+PD-L1 (Fig. 25C). Por tanto, la similitud del patrón de expresión entre las tres réplicas independientes dentro de cada condición, hacen posible la comparación entre cada estímulo usado.

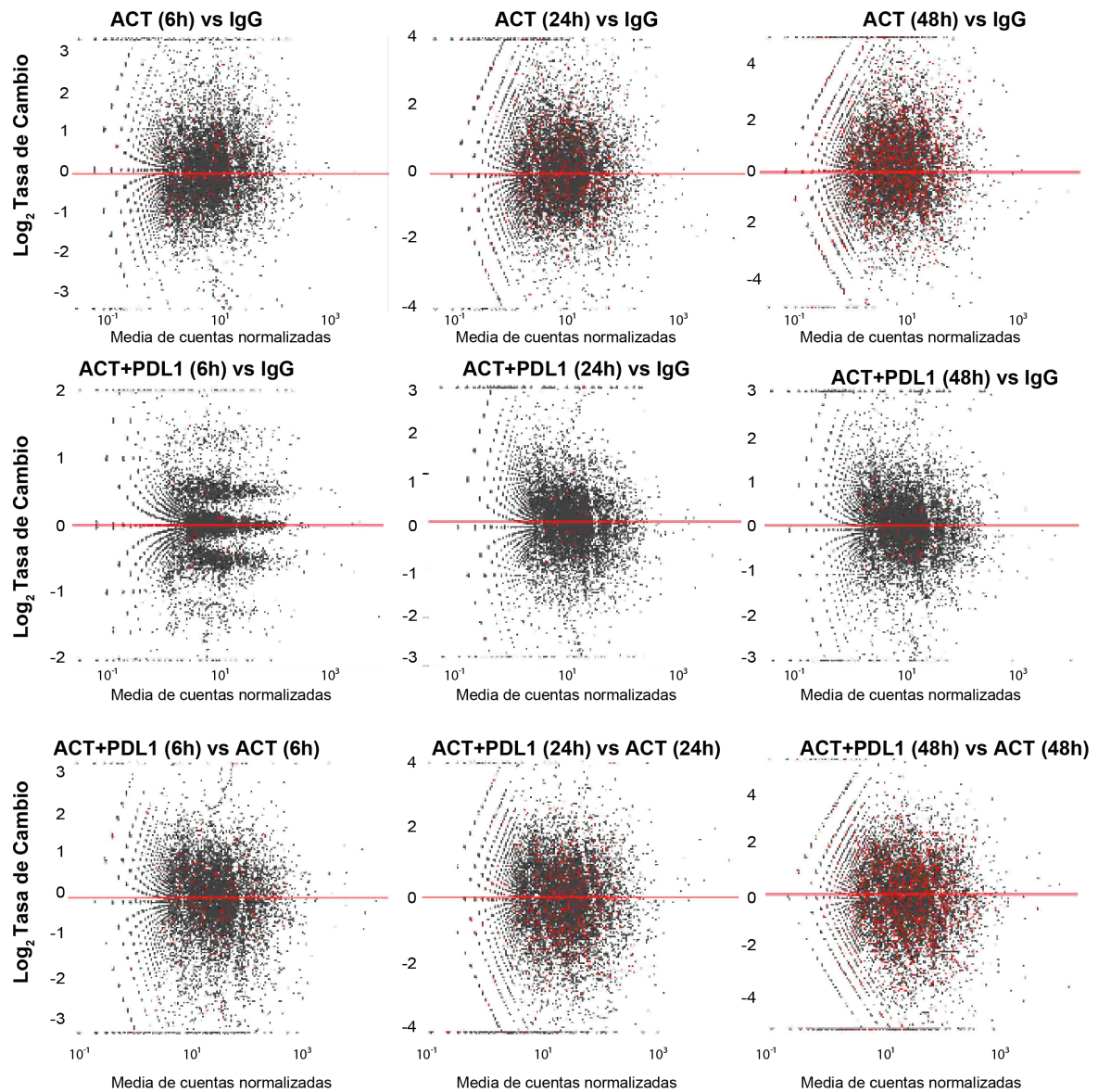


Fig. 24. Diferencias de expresión de genes obtenidos en RNA-seq representados mediante diagramas MA. Diagramas MA de los datos crudos obtenidos en RNA-seq transformados a logaritmo binario de cambio entre muestras (M) y la media normalizada de las cuentas obtenidas (A). Los puntos rojos indican genes diferencialmente expresados con un $FDR \leq 0.01$.

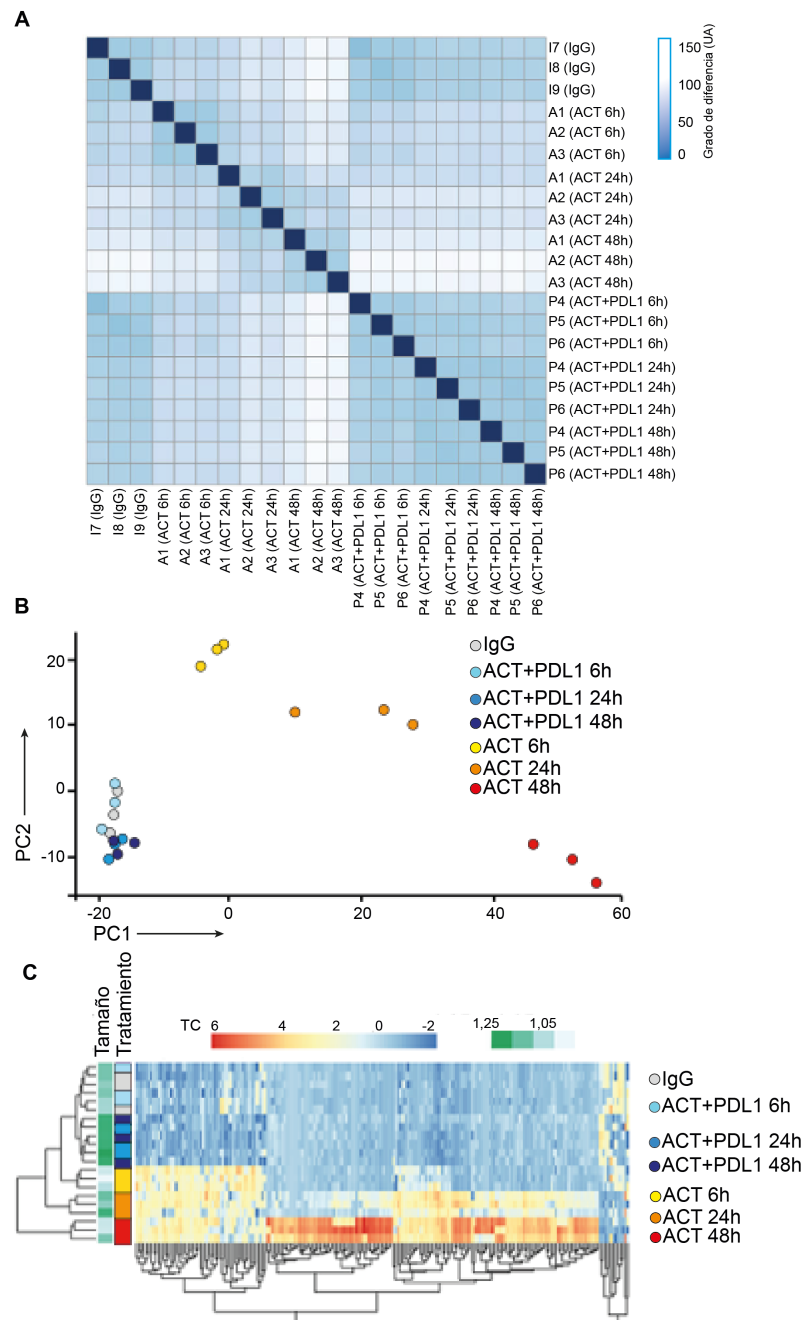


Fig. 25. Análisis de la disimilitud entre muestras. (A) Mapa de distancia Euclidiana en el transcriptoma de cada muestra utilizada; la barra de intensidad se muestra a la derecha. **(B)** Gráfico PCA usando valores crudos del ARN-seq transformados a rlog. Cada estímulo y tiempo es mostrado en un color diferente. **(C)** Agrupamiento jerárquico de los 200 genes con expresión más divergente. Cada estímulo y tiempo es mostrado en un color diferente en la columna tratamiento.

2.2.3 Validación de los resultados de RNA-seq por RT-qPCR.

Los datos obtenidos en el RNA-seq se normalizaron y se presentaron los resultados en formato Fiesta. Los genes que no mostraban expresión divergente con respecto a IgG no se tuvieron en cuenta para hallar la comparativa final entre las condiciones ACT y ACT+PD-L1, aceptando un $FDR < 0,05$ y una $TC \geq \pm 2$ se encontraron 5323 genes desregulados a las 48 horas de tratamiento (Fig. 26).

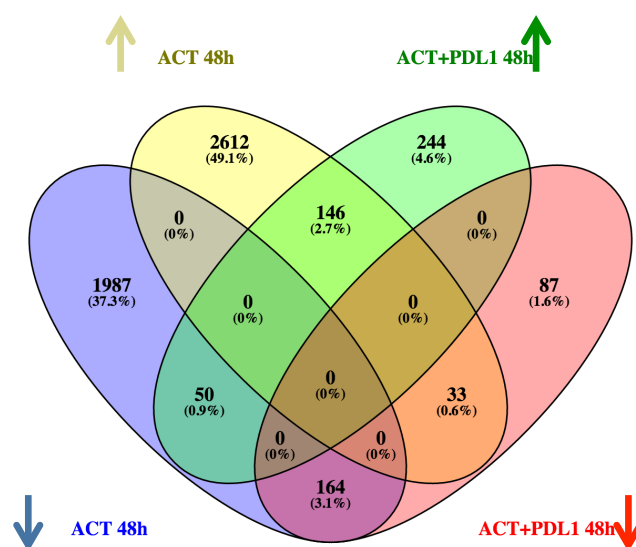


Fig. 26. Las condiciones ACT y ACT+PD-L1 modifican la expresión de genes en hCD8⁺. Representación en diagrama de Venn del número de genes diferencialmente expresados en células estimuladas 48h con las aAPC ACT y ACT+PD-L1, respecto de las control (IgG). Las flechas indican genes inducidos (flecha hacia arriba) o reprimidos (flecha hacia abajo).

El análisis de genes diferencialmente expresados en las primeras 6 horas del tratamiento, identificaron que los genes CTRL, TICAM2, MYOT, MYBPC2 y PHKA1 ($FDR < 0,05$ y $TC > 2$) eran inducidos por PD-L1; aunque ninguno de estos genes fue validado por qPCR en un set de muestras independientes (Fig. 27).

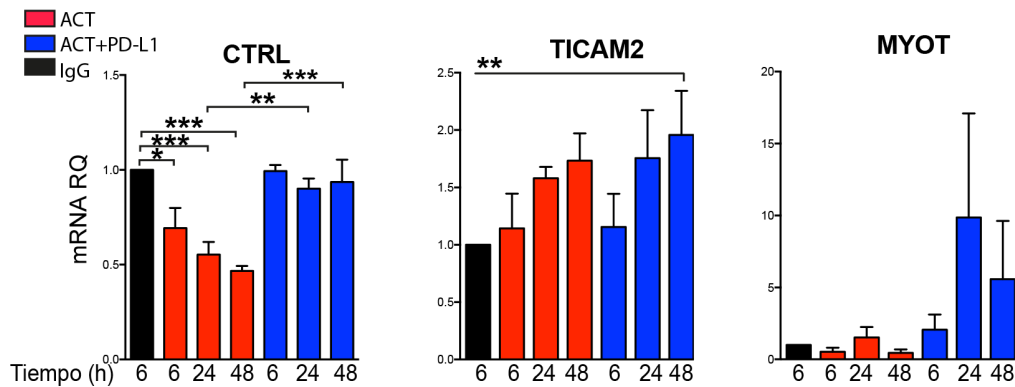


Fig. 27. No se encuentran diferencialmente expresados genes a las 6h de tratamiento. Expresión relativa (RQ) a 6, 24 y 48 horas de mRNAs por RT-qPCR de genes identificados a las 6h como diferencialmente expresados en RNA-seq. Los datos son media±SEM (n≥3), ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Two-way ANOVA Bonferroni post-test.

Se identificaron 50 genes inducidos por ACT+PD-L1, y reprimidos en ACT a las 48 horas (Fig. 26 verde brillante, Tabla 11). De ellos, *TENM1*, *FCRL6*, *C11ORF21*, *MEGF6*, *SULT1B1*, *TSPAN32*, *CCDC65*, *ADHFE1*, *DSC1*, *TRIB2*, *CECR1* y *RP11-539L10.2* fueron validados con mayor expresión a las 24 o 48 horas de tratamiento con PD-L1 comparado con IgG y ACT (Fig. 28). *PTPN13* e *IFN-AS1*, identificados en RNA-seq como inducidos en ACT+PD-L1 también fueron validados para esa condición (Fig. 29A). Genes identificados en RNA-seq como aumentados en ACT y reprimidos en ACT+PD-L1 (*RBBP8*, *DUSP4*, *LAYN*, *BHLE40*, *MPF1* y *BATF*), de los que *DUSP4*, *LAYN*, *BHLE40* y *BATF* se validaron por qPCR (Fig. 29B).

Los datos de qPCR muestran como gran parte de genes identificados en el análisis de los datos crudos de RNA-seq se comportan de forma similar en muestras independientes a 24 y 48 horas.

Tabla 11. Genes Inducidos por PD-L1 y reprimidos por ACT a las 48h.

<i>TENM1</i>	<i>CCDC146</i>	<i>CECR1</i>	<i>CYB561</i>	<i>LIME1</i>
<i>FCRL6</i>	<i>DSC1</i>	<i>NRBP2</i>	<i>PLEKHB1</i>	<i>IDUA</i>
<i>C11orf21</i>	<i>ACVR1C</i>	<i>TTN</i>	<i>LINC01011</i>	<i>RP11-539L10.2</i>
<i>MEGF6</i>	<i>CFH</i>	<i>SCML4</i>	<i>SSTR3</i>	<i>FBLN5</i>
<i>SULT1B1</i>	<i>TRIB2</i>	<i>LINC00402</i>	<i>C21orf49</i>	<i>AMT</i>
<i>TSPAN32</i>	<i>CACNA1I</i>	<i>ZNF683</i>	<i>LINC00174</i>	<i>SNX18</i>
<i>CCDC65</i>	<i>LINC00861</i>	<i>RP11-228B15.4</i>	<i>ADRB2</i>	<i>PARP15</i>
<i>KLHL3</i>	<i>GZMK</i>	<i>ACCS</i>	<i>A2M-AS1</i>	<i>SLC40A1</i>
<i>CTSF</i>	<i>ZMAT1</i>	<i>GSTM2</i>	<i>GSAP</i>	<i>APOL3</i>
<i>ADHFE1</i>	<i>FCGBP</i>	<i>ABCA7</i>	<i>POU5F2</i>	<i>CCDC141</i>

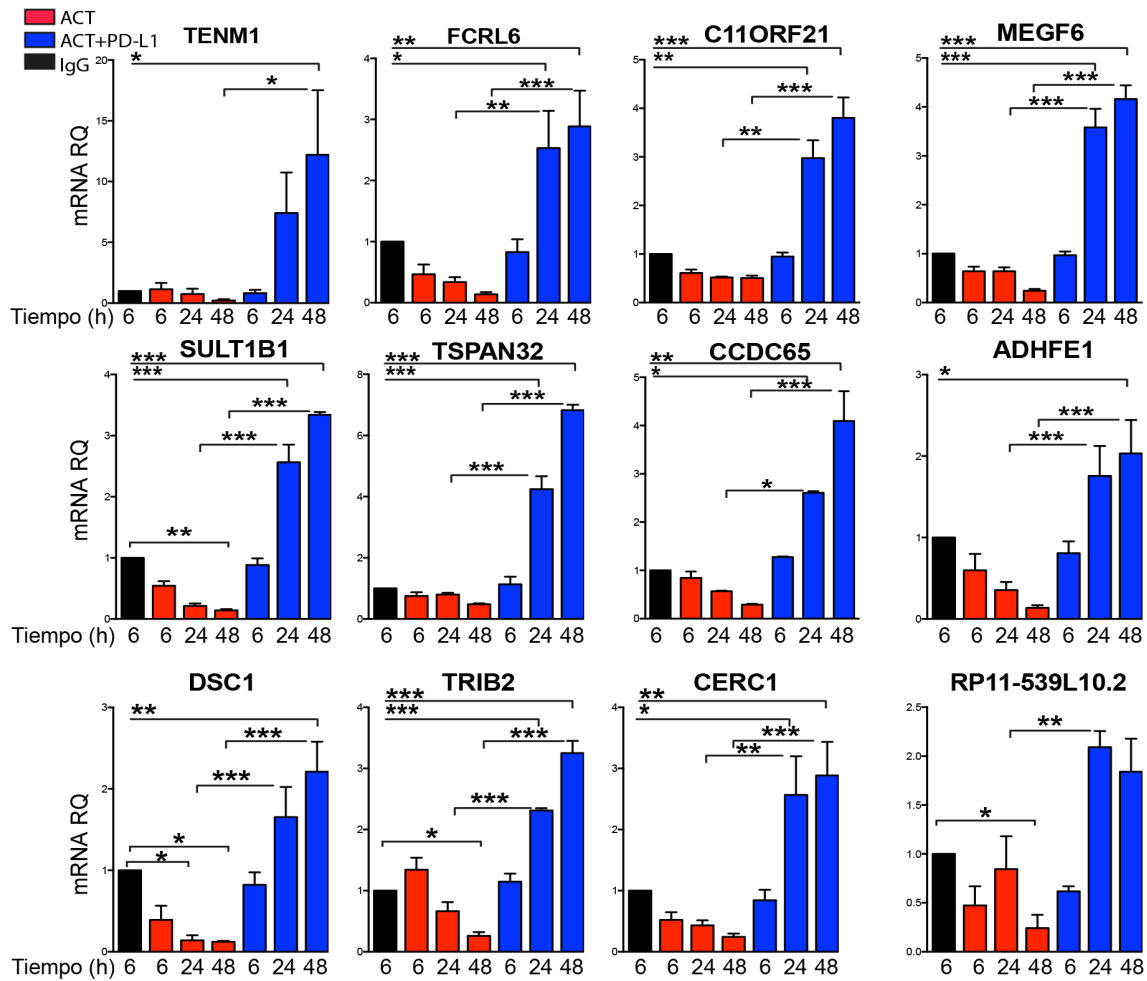


Fig. 28. Expresión relativa (RQ) de mRNAs por RT-qPCR identificados como desregulados en RNA-seq a las 48h. Los datos son la media±SEM (n≥3), ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Two-way ANOVA Bonferroni post-test.

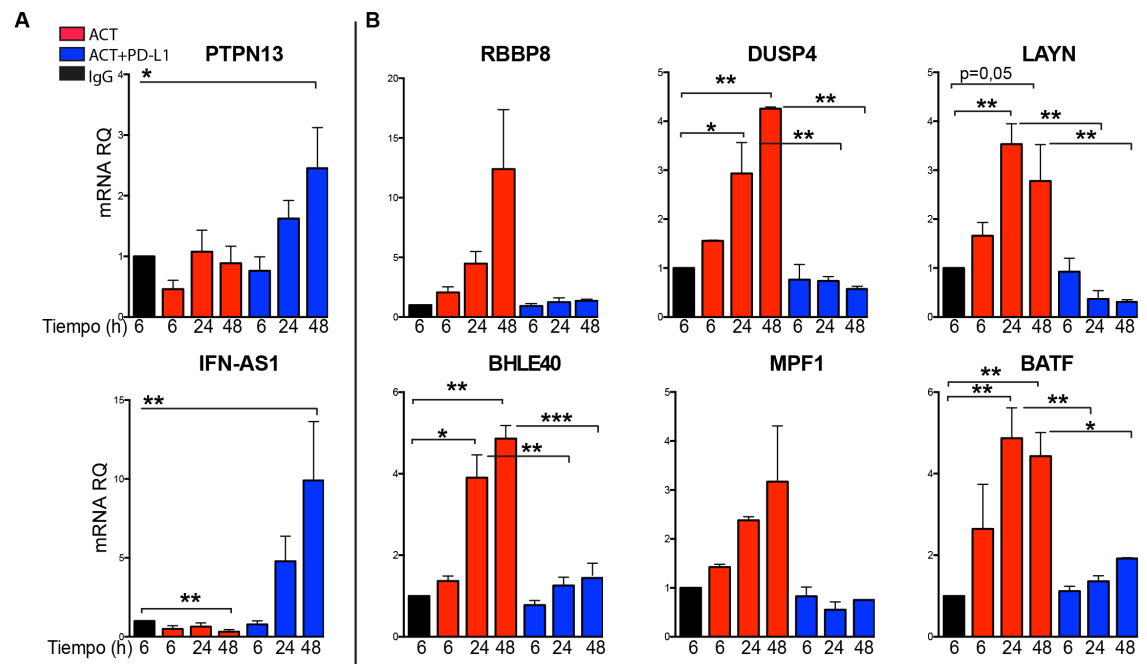


Fig. 29. Expresión relativa (RQ) de mRNAs por RT-qPCR de algunos genes identificados como diferencialmente expresados en el análisis por RNA-seq a las 48h. (A) Genes inducidos en ACT+PD-L1 y (B) inducidos en ACT. Los datos son la media±SEM (n≥3), ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Two-way ANOVA Bonferroni post-test.

2.3 La vía PD-1/PD-L1 regula la función mitocondrial.

2.3.1 La vía PD-L1/PD-1 afecta la expresión de genes de metabolismo celular.

Los datos de RNA-seq se analizaron con el test *likelihood ratio test* (LRT). Se identificaron 1651 genes con expresión divergente entre las condiciones IgG, ACT y ACT+PD-L1. De ellos, 578 pasaron el filtro de FDR <0,05. El análisis de vías utilizando la plataforma KEGG reveló que adicionalmente al ciclo celular y la función inmune, existía un enriquecimiento en 43 genes relacionados con el metabolismo (Fig. 30).

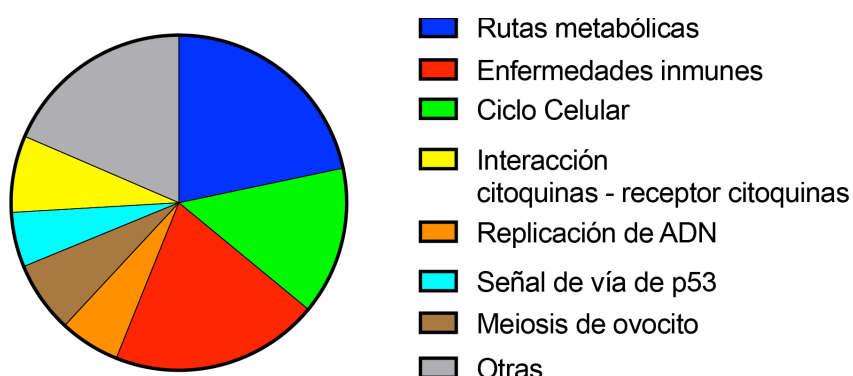


Fig. 30. Vías KEGG significativamente enriquecidas en los 578 genes desregulados con análisis LRT. Representación de las vías más enriquecidas.

También se sometieron los 578 genes a un análisis de categorías con la herramienta *Biological Network Gene Ontology* (BINGO) de la plataforma *Gene Ontology* (GO). Además de categorías enriquecidas en apoptosis y procesos metabólicos primarios, se hallaron 84 genes relacionados con categorías mitocondriales, implicados en vías metabólicas y en la organización y funcionalidad de la cadena transportadora de electrones.

Estos 578 genes también se analizaron con el programa *Short time-series Expression Miner* (STEM), que agrupa genes con patrón de expresión temporal similar. Al comparar las condiciones ACT+PD-L1 frente a ACT se generaron 8 modelos de expresión temporal significativamente enriquecidos con un FDR<0,05 (Fig. 31A). Los genes que componen los patrones de tendencia alcista números 42, 40 y 48 se sometieron a análisis mediante la plataforma *ReviGO*²⁰⁴, herramienta en la que se condensan en círculos las categorías GO no redundantes y se agrupan por similitud para identificar visualmente categorías relacionadas. Se obtuvo una agrupación enriquecida para genes mitocondriales procedentes de las comparaciones ACT+PD-L1 frente a ACT (Fig. 31B).

Los diferentes abordajes informáticos indican, que la vía PD-1/PD-L1 se asocia con la inhibición de genes relacionados con la función y organización mitocondrial y con genes relacionados con cambios en el metabolismo mediado por PD-1.

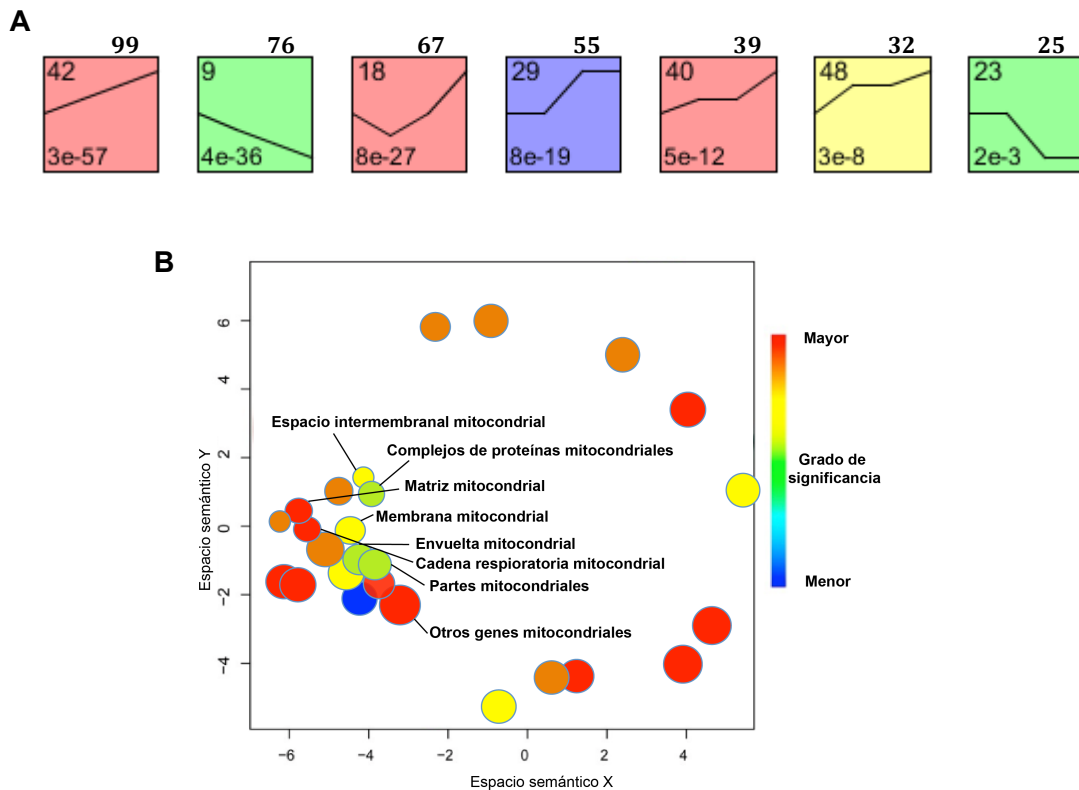


Fig. 31. El PD-1 bloquea la expresión de grupos de genes con funciones mitocondriales. (A) Patrones de expresión temporales similares comparando ACT+PD-L1 frente a ACT utilizando STEM. La línea muestra la media de expresión temporal de cada agrupación de genes. Solo se muestran los perfiles significativos según su p-valor, indicado en la esquina inferior izquierda. El número identificativo de cada cluster se muestra en la esquina superior izquierda, y el número de genes asociados a cada perfil, en la esquina superior derecha. (B) Gráfico de dispersión de Análisis Revigo usado para los clústers 42, 40 y 48 de STEM. El color de los círculos indica el grado de significancia según la leyenda, y el tamaño de los puntos indica la frecuencia de las categorías GO en la base de datos GOA²⁰⁵ (los círculos pertenecientes a categorías generales son más grandes).

2.3.2 La vía PD-1/PD-L1 bloquea la expresión de genes mitocondriales.

Se validó por qPCR la expresión de genes mitocondriales en los linfocitos T CD8⁺ estimulados a diferentes tiempos en las condiciones de IgG, ACT y ACT+PD-L1, en conjunto de muestras independientes. Se observó cómo la activación de la vía PD-1/PD-L1 es capaz de inhibir el incremento de mRNA de genes mitocondriales relacionados con la estructura de las crestas mitocondriales (CHCHD3, CHCHD10)^{172,206}, con la dinámica mitocondrial (MIEF1, MTFP1, MTFR2)²⁰⁷⁻²⁰⁹ y con la membrana mitocondrial (PHB, HSPA9)^{210,211} (Fig. 26). No se vieron diferencias en los niveles de expresión del mRNA de genes claves en la fusión y fisión mitocondrial (OPA, DRP) o en autofagia mitocondrial (PINK) (Fig. 32).

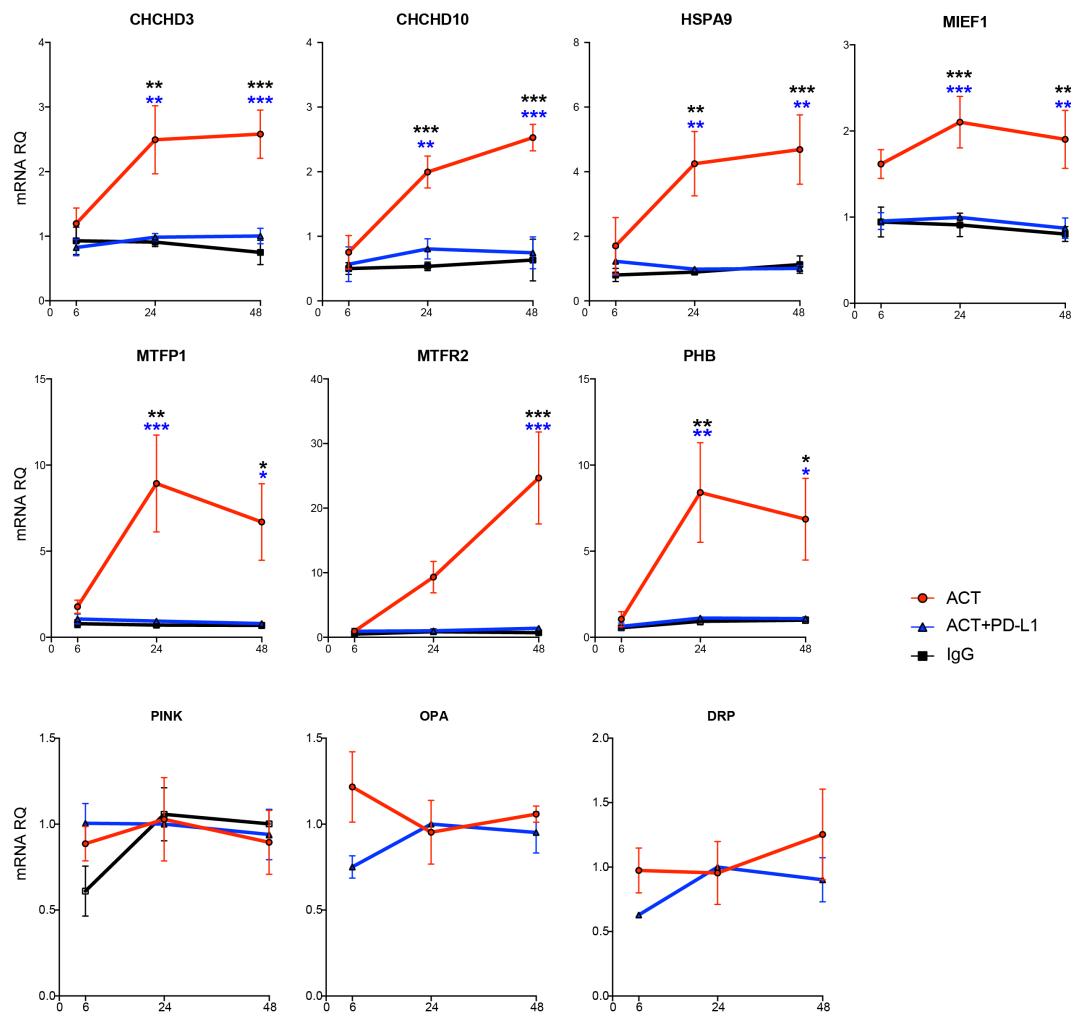


Fig. 32. Validación de genes mitocondriales diferencialmente expresados en células CD8⁺ estimuladas con aAPCs ACT, ACT+PD-L1 e IgG. Variación de la cantidad relativa (RQ) de la expresión de los genes indicados en células CD8⁺ estimuladas 48h con aAPCs ACT, ACT+PD-L1 o IgG. Los datos se muestran como media±SEM (n≥3), ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, Two-way ANOVA Bonferroni post-test.

Cuando se analizó por inmunoblot los niveles de las proteínas CHCHD3, CHCHD10 y MTFR2, se vio un claro aumento en la condición de activación y un bloqueo de ese aumento en presencia del PD-L1, datos en consonancia con los niveles del mRNA (Fig. 33). Se estudió la expresión de proteínas que forman parte de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte electrónico SDH-B (Complejo II), Core2 (Complejo III) y B-F1ATPase (Complejo V), no hallándose diferencias de expresión proteica entre las diferentes condiciones (Fig. 33). No fue posible determinar los niveles de NDUFs3, (Complejo I); COXIV y COX8A, (Complejo IV); debido al deficiente funcionamiento de los anticuerpos o a la insolubilidad de las proteínas. Otras proteínas mitocondriales tampoco mostraron diferencias de expresión estadísticamente

significativas en condiciones de activación de la vía del PD-1, como proteínas de la matriz mitocondrial (HSP60), o componentes de su membrana (HADHA). Para CPT1A, implicado en la oxidación de ácidos grasos, se observó una ligera tendencia alcista en las células estimuladas con ACT+PD-L1 (Fig. 33).

Por lo tanto, las predicciones informáticas del bloqueo de genes mitocondriales por PD-1 en los linfocitos T CD8⁺ fueron corroboradas tanto a nivel de mRNA como de proteína.

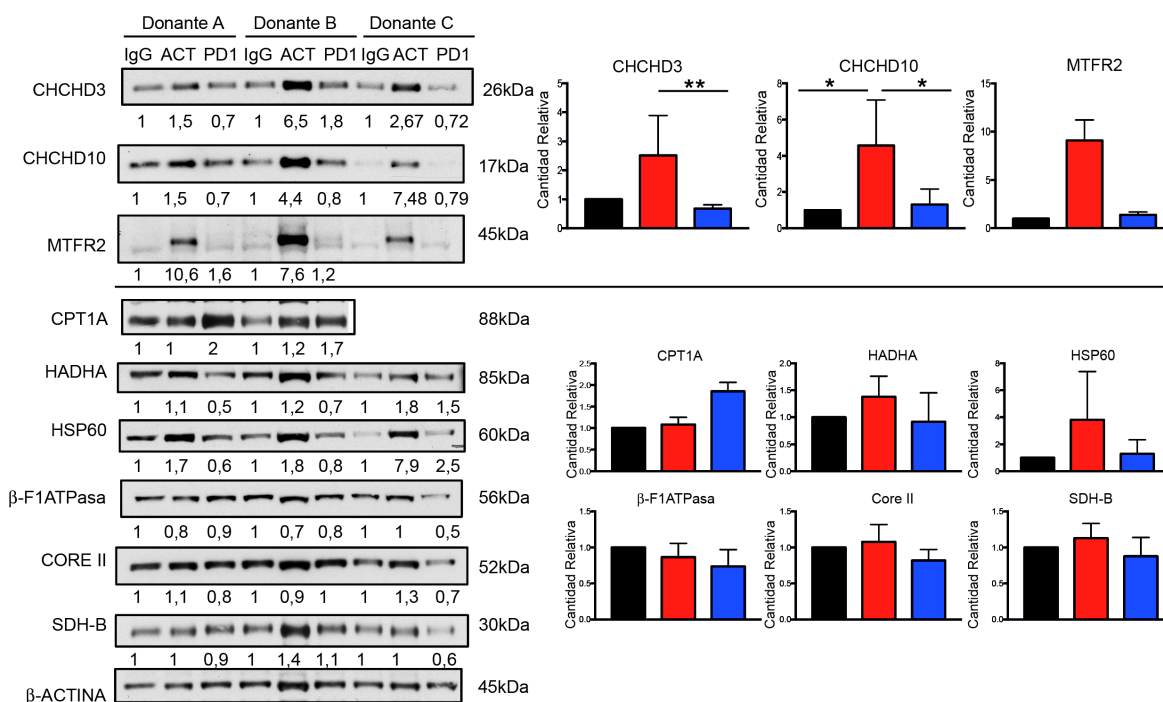


Fig. 33. La señalización del PD-1 bloquea el aumento de proteínas mitocondriales. Los extractos de células CD8⁺ de tres donantes diferentes fueron estimuladas 72h con las aAPCs indicadas (IgG, ACT o PD-L1 (PD1)), se resolvieron por SDS-PAGE y, tras transferencia, analizadas con los anticuerpos indicados. A la derecha, las bandas se densitometraron y el ratio de cada proteína con β-actina calculado tomando como referencia (1) el valor obtenido en la estimulación con aAPC IgG. Se representa en barras la cuantificación para n donantes independientes CHCHD3 (n=4), CHCHD10 (n=5), MTFR2 (n=2), CPT1A (n=2) y para el resto (n=3). **p<0,01, *p<0,05, Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post-test para comparaciones múltiples.

2.3.3 La vía PD-1/PD-L1 bloquea el aumento de la masa mitocondrial.

Ahondando en las diferencias mitocondriales, se quiso conocer la masa de mitocondrias en las diferentes condiciones de activación. Los linfocitos T hCD8⁺ activados en presencia de PD-L1 o sin estímulo presentaron una menor tinción con la sonda mitocondrial *MitotrackerGreen* (MTG) comparado con las células ACT (Fig. 34D,E). La cuantificación relativa del ADN mitocondrial (mtDNA) por qPCR es indicativo de la masa mitocondrial en su conjunto. ACT+PD-L1 mostró una menor cantidad de material genético mitocondrial con respecto a ACT, pero sin diferencias significativas con respecto a IgG (Fig. 34C). Se tomaron imágenes al microscopio electrónico de barrido para obtener imágenes a alta resolución de las mitocondrias (Fig. 34A). El conteo del número de mitocondrias por célula indicó, de nuevo, la menor cantidad de mitocondrias en linfocitos ACT+PD-L1 comparado con ACT (Fig. 34B). Mediante microscopía confocal se cuantificó el área mitocondrial en la célula, usando como marcador la enzima mitocondrial Aconitasa 2. Se observó mayor área mitocondrial en la condición de ACT comparado con ACT+PD-L1 e IgG (Fig. 34F,G).

También se observó una ligera tendencia en la que PD-1 tiene un efecto negativo sobre la cantidad de mitocondrias comparado con hCD8⁺ en la condición de IgG. Las diferentes aproximaciones para conocer la masa o número de mitocondrias sugieren que la señalización del PD-1 está involucrada en el bloqueo del aumento de mitocondrias que genera la activación de células hCD8⁺.

Se analizó la morfología de las mitocondrias, por si PD-1 pudiera estar afectando a su fisión o fusión. No se hallaron diferencias significativas en el aspecto circular de las mitocondrias mediante microscopía confocal tras tinción de Aconitasa 2 (Fig. 35).

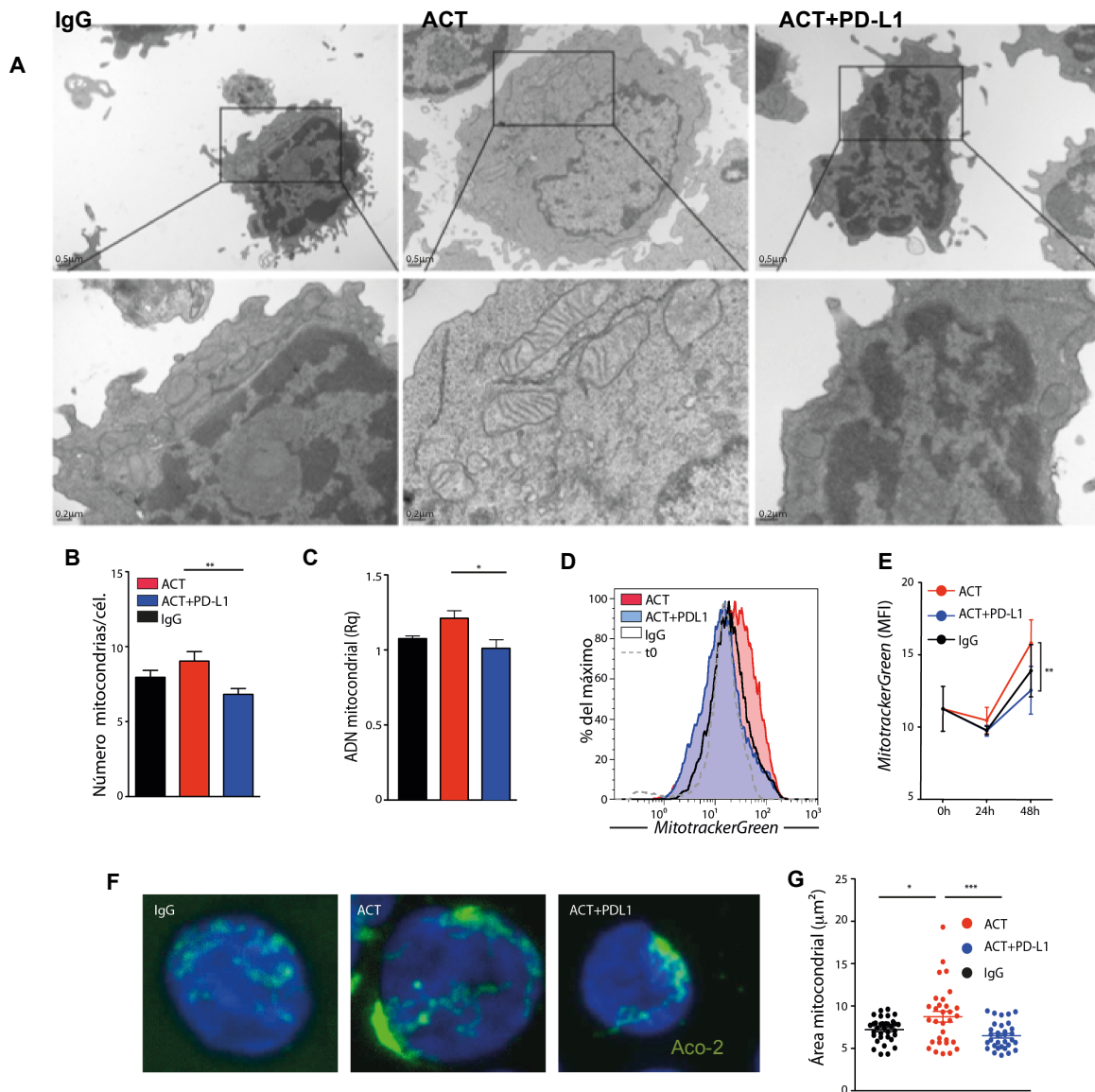


Fig. 34. El PD-1 impide el incremento de masa mitocondrial inducido por la activación. (A) Imágenes representativas tomadas al microscopio electrónico (ME) de células CD8^+ obtenidas tras 48h de estímulo con las aAPCs ACT, ACT+PD-L1 o IgG. (B) Cuantificación del número de mitocondrias a partir de las imágenes de EM. ($n \geq 83$ células por condición); los resultados son la media del conteo efectuado por dos observadores independientes. (C) Expresión relativa del número de copias de mtDNA ($n=3$). (D) Histograma representativo de la masa mitocondrial determinada con la sonda MitotrackerGreen en células CD8^+ estimuladas 48h con las aAPCs. (E) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los experimentos como en D ($n \geq 5$ donantes independientes). (F) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando la tinción mitocondrial con anti-Aconitasa-2 (Aco-2) en células CD8^+ estimuladas 48h como antes. (G) Cuantificación del área de tinción mitocondrial a partir de las imágenes como en F. Se muestra el área en μm^2 (n de al menos 31 células por condición). (B,C,E) Los datos son la media \pm SEM, (G) Cada punto representa el valor de área de una célula individual, y el valor medio es indicado por la línea horizontal \pm SEM, (B,G) *** $p < 0,001$ * $p < 0,05$ One-way ANOVA Bonferroni post test, (C) * $p < 0,05$ RM One-way ANOVA Bonferroni post test, (E) ** $p < 0,01$ two-way ANOVA Bonferroni post test.

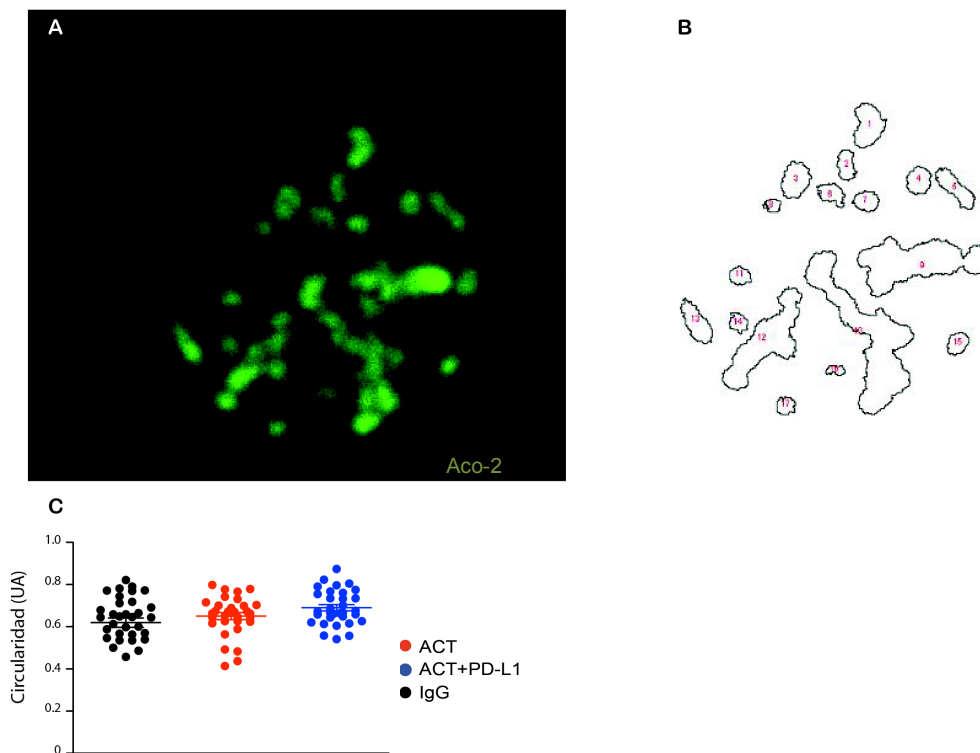


Fig. 35. La señalización del PD-1 no afecta a la morfología mitocondrial. (A,B) Imágen de microscopía confocal representativa para hallar el grado de circularidad media obtenido a usando *ImageJ* con el *macro* de morfología mitocondrial¹⁸⁷. (A) Imagen de una célula hCD8⁺ en condiciones de ACT con tinción mitocondrial mediante anti-Aconitasa-2 (en verde), (B) Delimitación mitocondrial procesado por el *macro*. (C) Cuantificación de la circularidad. Cada punto representa el valor de circularidad media de las mitocondrias de una célula, y el valor medio es indicado por la línea horizontal±SEM en cada condición, $n \geq 31$ células por condición, *One-way ANOVA Bonferroni post test*.

2.3.4 La vía PD-1/PD-L1 limita el número y la longitud de las crestas mitocondriales.

Observando las imágenes tomadas al microscopio electrónico, fueron evidentes las diferencias en las crestas mitocondriales en las distintas condiciones de estimulación. Las crestas mitocondriales son el soporte mitocondrial donde se genera el gradiente de potencial necesario para la generación del ATP. De tal manera que una mitocondria debe tener una diferencia de potencial entre sus crestas y su matriz para ser considerada una mitocondria activa o funcional.

A partir de las imágenes de microscopía electrónica (Fig. 36A), se cuantificó la longitud de las crestas y su número. Se apreció una disminución del número de crestas mitocondriales por célula en ACT+PD-L1 e IgG comparado con ACT (Fig. 36B), también fue menor la longitud de las crestas mitocondriales en ACT+PD-L1 e IgG (Fig. 36C).

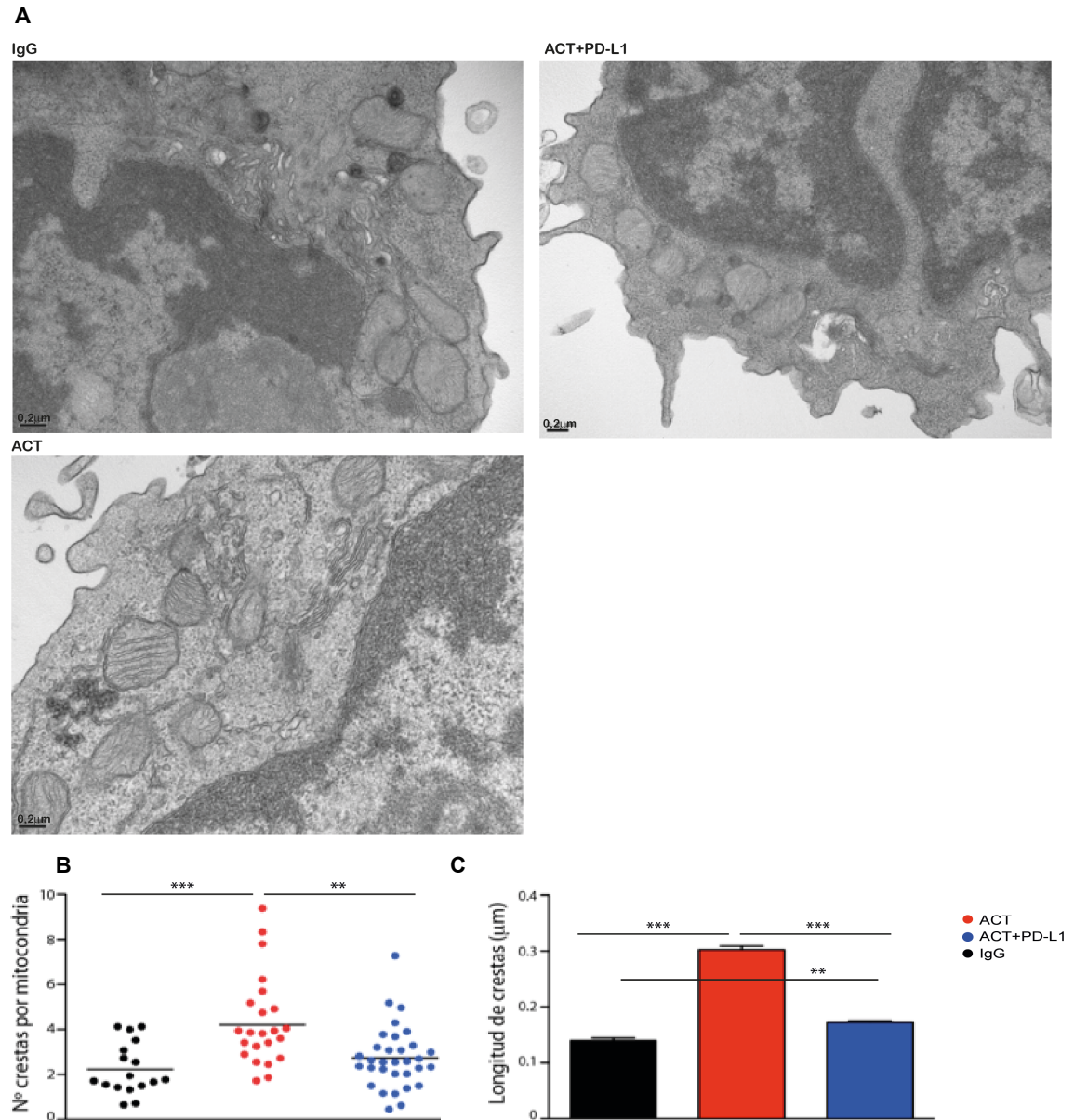


Fig 36. PD-1 afecta negativamente al número y longitud de las crestas mitocondriales. (A) Cuantificación de la longitud de crestas mitocondriales medidas a partir de las imágenes de ME. Valores medios \pm SEM. ($n \geq 226$) (B) Cada punto representa el número medio de crestas por mitocondria de cada célula individual a partir de las imágenes de ME, y el valor medio es indicado por la línea horizontal. ($n \geq 17$ células por condición) (C) Imágenes representativas de células estimuladas con las aAPCs indicadas y utilizadas para la cuantificación de las crestas mitocondriales. (A,B) *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ One-way ANOVA Bonferroni post test.

Para detectar la actividad mitocondrial usamos la sonda TMRM, que se incorpora a las mitocondrias dependiendo de su diferencia de potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). Se usó como control de polarización mitocondrial el desacoplante de la cadena transportadora de electrones 2,4-dinitrofenol (DNP). Los resultados demostraron cómo el eje PD-1/PD-L1 y la condición IgG mantienen un significativo menor porcentaje de células con mitocondrias funcionales con respecto a las células ACT. También se observó una tendencia en la que el porcentaje de células TMRM⁺ fue ligeramente menor para todos los experimentos en la condición ACT+PD-L1 que en IgG, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 37A,B). Los valores de fluorescencia media también mostraron la mayor polarización mitocondrial en las células ACT (Fig. 37D).

Por lo tanto, las hCD8⁺ con la vía PD-1 activa bloquean la elongación y formación de crestas mitocondriales, bloqueando también el incremento de diferencia potencial de membrana mitocondrial que se produce en células ACT.

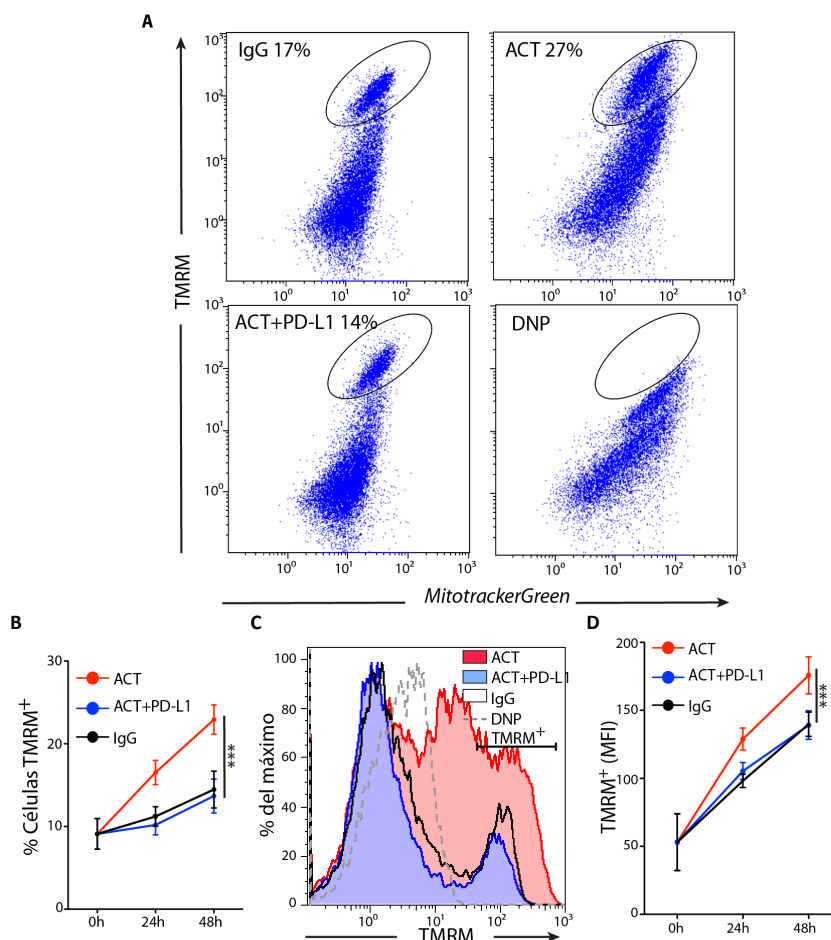


Fig. 37. Reducción del potencial de membrana mitocondrial en células estimuladas con PD-L1. (A) Tinción representativa de células hCD8⁺ con TMRM y *MitotrackerGreen* tras 48h de estimulación con las aAPCs indicadas. Las células se incubaron con DNP como control negativo de $\Delta\Psi_m$. Se indica el porcentaje de células con $\Delta\Psi_m$ positivo (n=5). **(B)** Cuantificación del porcentaje de células CD8⁺TMRM⁺ (n=5). **(C)** Histograma representativo de la tinción con TMRM tras 48h; a su derecha (D), intensidad media de fluorescencia de la ventana asignada a TMRM⁺ en el gráfico anterior. Valores medios \pm SEM (n=5), ***p<0.001 *Two-way ANOVA Bonferroni post test*.

2.3.5 La vía PD-1/PD-L1 restringe la respiración celular.

Mediante la tecnología *SeaHorse XF* es posible medir en células vivas el consumo de oxígeno (OCR), y parámetros asociados, mediante la adición de sucesivos bloqueantes de la cadena transportadora de electrones (descrito en materiales y métodos). Se quiso determinar el estado metabólico mitocondrial en linfocitos hCD8⁺ a las 48h de tratamiento con las aAPCs recubiertas de IgG, ACT y ACT+PD-L1. El perfil de consumo de oxígeno (Fig. 38A) de las células hCD8⁺ indicó que en la condición IgG y ACT+PD-L1 los niveles basales de respiración fueron muy inferiores (≈ 50 pmoles/min) a los obtenidos en la condición ACT (~ 300 pmoles/min) (Fig. 38B). El OCR máximo, determinado tras la adición del desacoplador de la CTE FCCP, mostró la menor inducción en las células tratadas con ACT+PD-L1 (< 200 pmoles/min), seguido de IgG (~ 200 pmoles/min); y la mayor inducción de ACT (~ 650 pmoles/min). Esto indica que las mitocondrias de las células ACT+PD-L1 poseen un menor número de complejos mitocondriales totales y/o menos mitocondrias funcionales, con respecto a ACT (Fig. 38C). La diferencia entre el OCR máximo y basal (SRC, Fig. 38D), indicó como las condiciones IgG (~ 150 pmoles/min) y ACT+PD-L1 (< 150 pmoles/min) ven limitada su capacidad de respuesta frente a una situación de estrés con respecto a ACT (380 pmoles/min). Lo que implica menos complejos mitocondriales de repuesto frente a situaciones de estrés y/o menos mitocondrias potencialmente activas. La ausencia de diferencias en el porcentaje del incremento de SCR (Fig. 38E), indica que la proporción de complejos mitocondriales de repuesto es idéntica entre todas las condiciones. El escape de protones hacia el interior de la mitocondria fue significativamente mayor en las células ACT (Fig. 38F), probablemente debido a un mayor gradiente de potencial mitocondrial. El consumo de oxígeno no debido a mitocondrias no arrojó valores diferenciales entre ninguna condición (Fig. 38G).

Los datos indicaron el fuerte bloqueo de la respiración mitocondrial en condiciones ACT+PD-L1, manteniendo a las células en un estado de respiración similar a células no activadas.

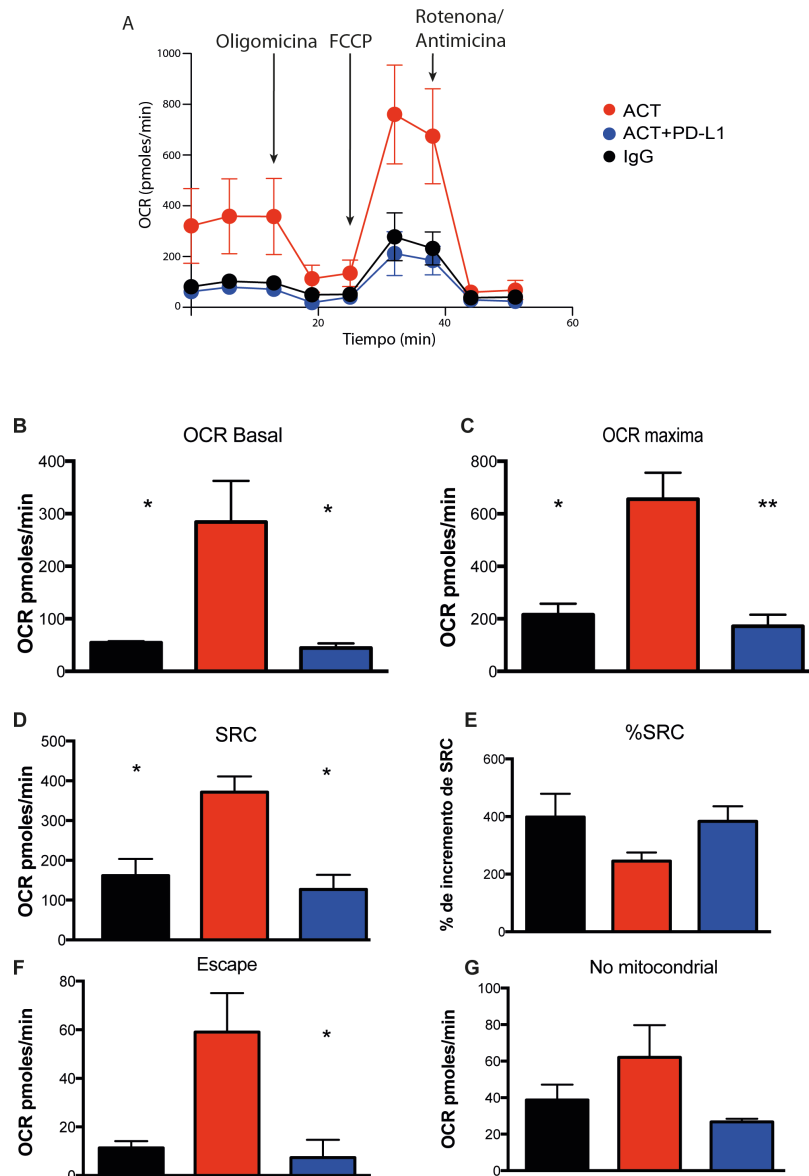


Fig. 38. PD-1 inhibe la fosforilación oxidativa inducida por la estimulación del TCR. Las células CD8⁺ se estimularon 48h con las aAPCs y se determinó la actividad mitocondrial mediante *SeaHorseXF*. (A) Perfil de OCR en tiempo real durante el ensayo tras la adición de los inhibidores mitocondriales indicados, (B) OCR basal, (C) OCR máxima (D) SRC (OCR máxima - OCR basal), (E) porcentaje de SRC (respecto a OCR basal) (F) Fuga de protones (G) Respiración no mitocondrial. Los datos son la media \pm SEM en 3 experimentos independientes (n=6 donantes), *p<0.05 Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post-test para comparaciones múltiples.

2.3.6 La vía PD-1/PD-L1 limita el uso de la glicólisis.

Siguiendo con el análisis metabólico, se quiso comprobar el estado glucolítico de las células hCD8⁺ tras los diferentes estímulos. Se midió la producción de lactato en extractos celulares tras 48h de estimulación. Las hCD8⁺ ACT, produjeron una cantidad significativamente mayor (>4 μ M) que las condiciones IgG y ACT+PD-L1 (<2 μ M), las cuales fueron similares (Fig. 39A).

Mediante *SeaHorse XF* se midió la producción de protones o acidificación del medio extracelular (ECAR) tras 48 horas de estímulos IgG, ACT o ACT+PD-L1, esta acidificación está principalmente asociada al funcionamiento de la vía de la glucólisis. Las hCD8⁺ ACT produjeron variaciones medias de 35mpH/min, mientras que en IgG y ACT+PD-L1 los valores fueron vagamente detectables (Fig. 39B). Con FCCP en el medio, la acidificación del medio apenas produjo variación en IgG y ACT+PD-L1 comparado con ACT; lo que indica que estas células se encuentran en unos niveles basales de consumo de energía.

Los dos abordajes coinciden en señalar a las hCD8⁺ ACT con un mayor consumo de glucosa para la obtención energía.

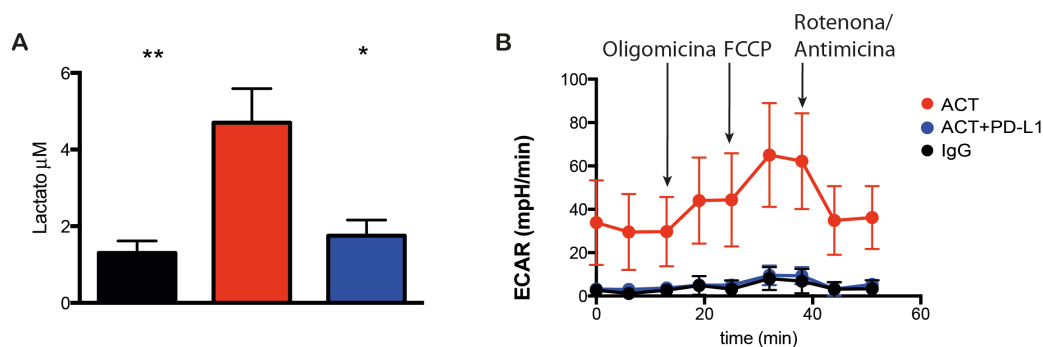


Fig. 39. El PD-1 inhibe la glucólisis inducida por la estimulación del TCR. Células primarias CD8⁺ cultivadas con los estímulos indicado. **(A)** Concentración de lactato intracelular a las 48h tras la estimulación. **(B)** ECAR medido mediante *SeaHorse XF* a las 48h tras la estimulación. Los datos son la media \pm SEM en 3 experimentos independientes (n=6 donantes), **<0,01 *p<0,05 Kruskal-Wallis seguido de Dunn's post-test para comparaciones múltiples.

2.3.7 La sobreexpresión de proteínas individuales del complejo MICOS no rescata el efecto de PD-1 sobre la polarización mitocondrial.

Los menores niveles de proteínas implicadas en la formación y morfología de las crestas mitocondriales podrían tener como consecuencia el menor número de mitocondrias polarizadas, y la menor activación de las células hCD8⁺. Para revertir el efecto que provoca la señalización del PD-1, se sobreexpresaron dos de las proteínas cuyo aumento se bloquea en ligación de PD-L1, CHCHD3 y CHCHD10, fusionadas con el "tag" de la hematoaglutinina (HA) del virus de la gripe.

RESULTADOS

Se transfectaron células HEK-293T con un plásmido bicistrónico para la expresión de EGFP junto a HA-CHCHD3 o junto a HA-CHCHD10. Se comprobó la correcta colocalización de HA-CHCHD3 y HA-CHCHD10 en células GFP⁺ (Fig. 40), no hallándose tinción para HA en las células que no expresaban GFP⁺.

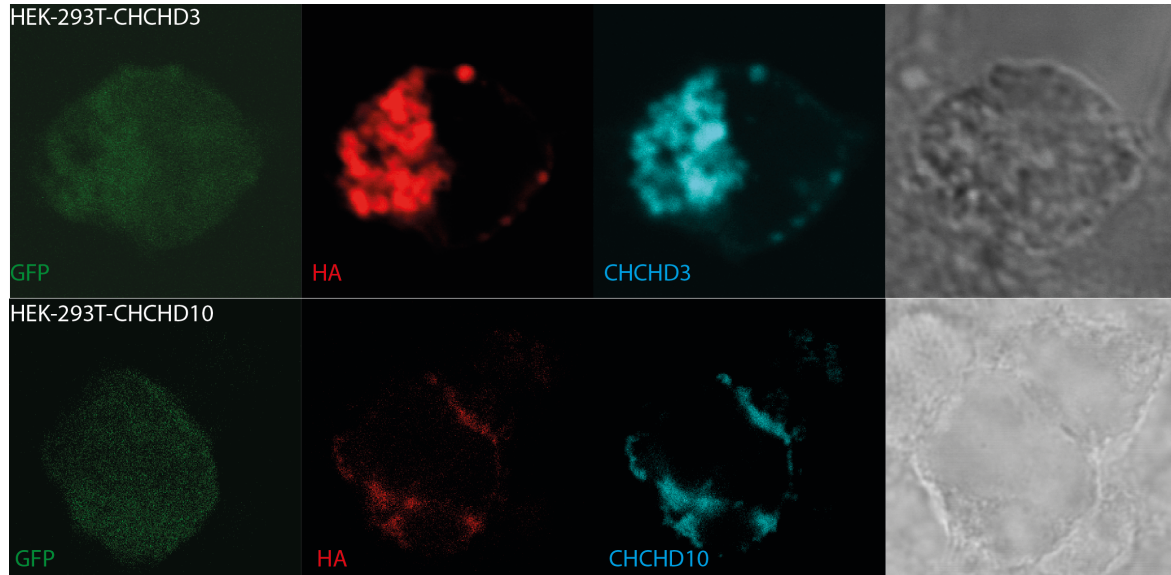


Fig. 40. Las proteínas sobreexpresadas coinciden con los anticuerpos anti-CHCHD3 y anti-CHCHD10. Imágenes de microscopía confocal de células HEK-293T, las cuales expresan el plásmido (células verde) que codifica para HA-CHCHD3 o HA-CHCHD10. En rojo se muestra la tinción con un anticuerpo anti-HA y en cian con los anticuerpos anti-CHCHD3 o CHCHD10; a la derecha se muestra la imagen de campo claro.

Las células hCD8⁺ de dos donantes diferentes se infectaron con los plásmidos anteriores. Seleccionadas las células GFP⁺, no se vieron incrementados los niveles de $\Delta\Psi_m$ en células que sobre expresaban las proteínas HA-CHCHD3 o HA-CHCHD10 con respecto a las células que expresaban un plásmido control en ninguna de las condiciones IgG, ACT o ACT+PD-L1 y en ninguno de los donantes (Fig. 41, se muestra la condición ACT+PD-L1).

La reducción de estas proteínas mediante silenciamiento con shRNAs no ha sido efectiva para la selección de células con expresión de EGFP, por lo que se está intentando aumentar la eficiencia de las infecciones celulares.

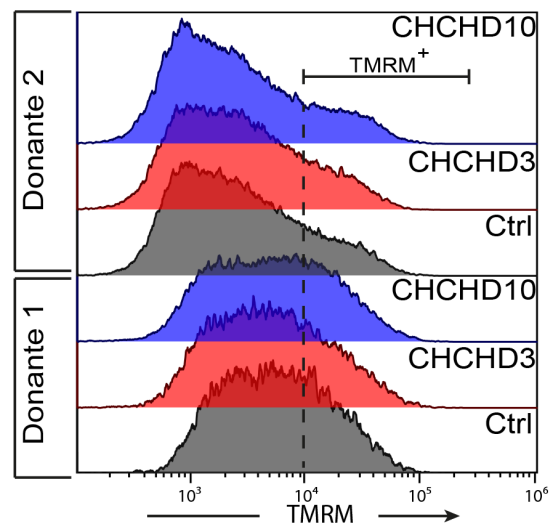


Fig. 41. La sobreexpresión de CHCHD3 o CHCHD10 no genera cambios en el $\Delta\Psi_m$. Histograma para la tinción con TMRM de células hCD8⁺ GFP⁺ de dos donantes diferentes infectadas para la expresión de las proteínas indicadas (Control, CHCHD3 o CHCHD10) y estimuladas con ACT+PD-L1 durante 48h. La línea de puntos indica la ventana asignada a las células con un $\Delta\Psi_m$ activo determinado con DNP.

DISCUSIÓN

El sistema inmune posee diferentes mecanismos de regulación para evitar las reacciones autoinmunes y que, al mismo tiempo, permitan la defensa frente a agentes externos. Las regulaciones situadas en diferentes niveles, son mecanismos para mantener la homeostasis cuando ocurren alteraciones que pueden ser dañinas para el propio organismo. A lo largo de este trabajo se han estudiado dos elementos reguladores del sistema inmune englobados en la modulación de la tolerancia inmunológica. El miR-223 regula la actividad efectora del sistema innato y su desregulación potencia una patología autoinmune, mientras que el receptor PD-1 disminuye las respuestas del sistema adaptativo para evitar una potencial autoinmunidad.¹ El miR-223, regulado por Notch, es capaz de aumentar las citoquinas inhibiendo la vía del AhR en macrófagos de pacientes de AR.

1. La desregulación del eje Notch / miR-223 / AhR en macrófagos de AR.

La caracterización de miRNAs en células CD14⁺ de AR nos permitió identificar al miR-223 sobreexpresado en el líquido sinovial de pacientes de AR, y correlacionarlo con una menor expresión del receptor Notch3. Demostramos que el miR-223 es capaz de disminuir los niveles de ARNT, un colaborador necesario para la correcta actividad de la vía AhR, por lo que disminuyen los genes inducidos por AhR en tejidos de pacientes de AR. También se reduce la acción antiinflamatoria del AhR, lo que promueve la producción de citoquinas involucradas en el desarrollo de la AR.

El estudio se centró en los macrófagos por ser una de las poblaciones celulares que más se correlacionan con la progresión de la enfermedad. Hemos aislado poblaciones CD14⁺ del líquido sinovial de AR y de tejido sinovial de OA; ambas poblaciones pueden considerarse comparables ya que las células CD14⁺ que aparecen en el fluido sinovial solo pueden provenir de la membrana sinovial, donde los monocitos periféricos se diferencian a MΦ. Por otra parte, no hay extravasación directa desde el torrente sanguíneo al líquido sinovial²¹², lo cual limita que las células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial provengan directamente de la sangre. Aunque CD14 es un marcador de monocitos o macrófagos, las células del líquido sinovial que expresan moléculas MHC-II (HLA-DR⁺) se identifican morfológicamente con el tipo celular de macrófago¹⁸⁸; y se correlacionan con un fenotipo inflamatorio M1¹⁸⁹. Se ha descrito que durante la diferenciación de monocito a macrófago los niveles del miR-223 se reducen y, consecuentemente, hay un aumento de la expresión de IKKα⁶⁴. La ausencia de cambios observados en los niveles del mRNA de IKKα entre las células CD14⁺ aisladas de

pacientes de AR y OA (Fig. 13), apoyan que las células aisladas de líquido sinovial no son monocitos, sino una población con características de macrófagos.

Varios estudios han querido identificar miRNAs expresados diferencialmente en AR con respecto a situaciones control, incluyendo individuos sanos y pacientes de OA. Se ha descrito el incremento del miR-223 en líquido sinovial de AR y su correlación con el grado de lesión²¹³. También en el líquido sinovial de AR el miR-let-7b es expresado en niveles elevados, y puede ser transportado en exosomas para polarizar los MΦ hacia un fenotipo proinflamatorio²¹⁴. El miR-155 está sobreexpresado en células CD14⁺ de líquido sinovial de pacientes de AR comparado con CD14⁺ de sangre periférica de esos mismos pacientes, y con mayor expresión en tejidos de AR comparado con OA⁵³. Nuestros datos genómicos no identificaron al miR-let-7b ni al miR-155 como diferencialmente expresados (Fig. 8) debido a que, posiblemente, nuestra comparativa es propia de MΦ y de orígenes diferentes con respecto a los otros modelos de estudio anteriores. En el sentido contrario, el miR-125b disminuye en respuesta a condiciones inflamatorias²¹⁵ y en nuestro caso, es el miRNA que menos se expresa en los pacientes de AR.

Los niveles elevados del miR-223 en pacientes de AR en el tejido sinovial⁶⁸ o en los linfocitos periféricos⁶⁷, junto a su papel en desarrollo de CIA⁶⁹ apoyan los altos niveles del miR-223 en MΦ encontrados en nuestro estudio. Sugerimos que el aumento del miR-223 puede promover el incremento en la producción de determinadas citoquinas proinflamatorias. Esto, sin embargo, parece estar en contradicción con estudios en los que se ha mostrado que el miR-223 en MΦ silencia NLRP3 y causa la reducción de IL-1β⁶¹. Una explicación para dicha discrepancia es que en ese estudio sobreexpresan el miR-223 bajo un promotor regulado por *Doxiciclina*, un compuesto que puede actuar como inhibidor de IL-1β^{216,217}. Los altos niveles del miR-223 también se han relacionado con la reducción de citoquinas proinflamatorias vía PKNOX1 y STAT3 en ratones. Sin embargo en células humanas miR-223 atenúa los niveles de IKKα⁶⁴ relacionado con el aumento de citoquinas proinflamatorias en MΦ^{65,66}, lo que sugiere un comportamiento diferente entre células humanas y de ratón.

Nuestros resultados indican que el miR-223 no se encuentra elevado en pacientes de AR por la actividad de citoquinas activadoras de MΦ presentes en el líquido sinovial (Fig. 9C) (TNFα e IFNγ)²¹⁸. Aunque es cierto que otras muchas citoquinas están presentes en el líquido sinovial de AR (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TGFβ, GM-CSF)^{190,219,220} el hecho de que dos citoquinas involucradas en AR no induzcan la expresión del miR-223, podría indicar que los elevados niveles del

miR-223 en AR son desencadenantes de inflamación y no consecuencia de ésta. Otros estudios indican que el LPS es capaz de reducir los niveles del miR-223^{63,221}; aunque en nuestro estudio no se haya comprobado este hecho, los resultados de inducción de citoquinas proinflamatorias con LPS no se verían afectados puesto que en las situaciones control también están bajo el LPS incidiendo de la misma forma sobre miR-223 (Fig. 16).

El análisis de los factores de transcripción que se unen al promotor del miR-223 identificó al represor HEY-1, sugiriendo la vía de Notch como reguladora de la expresión del miR-223. En nuestro estudio, además de Notch3, los niveles de HES-1 y HEY-1 indican un menor impacto global de Notch²²² en los MΦ de AR (Fig. 10). Aunque algún estudio apunta hacia la regulación negativa de Notch3 sobre Notch1⁷⁸, estudios posteriores identificaron a Notch3 como promotor de HES-1 y HEY-1^{80,223}. El efecto de la vía de Notch sobre la expresión del miR-223 es controvertido. Usando células de *leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL)*, en la cuales la vía de Notch se encuentra activada en más del 50% de los casos, se ha encontrado que Notch puede inducir o reprimir la expresión del miR-223. Así, la sobreexpresión del fragmento intracelular de Notch induce miR-223 de forma dependiente de la vía NFκB²²⁴. Por el contrario, la inhibición de la vía de Notch en líneas celulares humanas de T-ALL con inhibidores de γ-secretasa induce la expresión del miR-223²²⁵. Nuestros datos indican que la sobreexpresión de HEY-1 reprime el miR-223, confirmando el efecto inhibitor de la vía de Notch sobre miR-223. Otros reguladores positivos del miR-223, como PU.1, son inhibidos por Notch²²⁶, por lo que HEY-1 podría actuar sobre la expresión del miR-223 de forma directa e indirecta.

La relación de Notch con las enfermedades inflamatorias también han sido estudiada, aunque de nuevo los resultados son contradictorios; algunos estudios sugieren un papel proinflamatorio²²⁷, y otros antiinflamatorio en MΦ⁹³. Los niveles de Notch1 y Notch2 no se vieron afectados en los MΦ de AR comparados con los de OA; pero dadas las diferentes funciones que poseen los receptores y ligandos de Notch²²⁸, cabría la posibilidad de que Notch3 ejerciera una señalización específica sobre el miR-223 en el contexto de AR. Nuestros resultados, de hecho, indican que los diferentes ligandos de Notch no generan la misma respuesta sobre el miR-223 (Fig. 12); JAG2 y DLL1 fueron los que más potenciaron el descenso del miR-223, mientras que JAG1 no produjo cambios significativos en los experimentos de cocultivo. El hecho de que JAG2 genere las señales de Notch3 más potentes y JAG1 las más débiles sobre las células T²²⁹, apoya el gradiente represivo de estos ligandos sobre los niveles del miR-223. Las modificaciones en el balance ligando-receptor, afectan a la fuerza de la señal llevando a

las células a una diferenciación específica²³⁰. Aunque más adelante se discuten las posibles causas de las variaciones de los niveles de Notch por su relación con la vía del AhR, también pueden intervenir otros factores que no hemos investigado. Por ejemplo, estudios epigenéticos demuestran cómo la vía de Notch se ve aumentada en OA²³¹, y que Notch3 puede silenciarse por metilaciones en leucemias linfoblásticas de células B²³². También es posible que aberraciones en la expresión en los ligandos de Notch en los tejidos que rodean las regiones inflamadas puedan inhibir las señalizaciones de Notch⁸³, al producirse una inhibición competitiva por la unión al receptor.

En nuestros estudios también investigamos cuales podrían ser los genes sobre los que podría estar actuando el miR-223. Predicciones bioinformáticas nos indicaron la vía del AhR, una vía relacionada con AR¹⁰⁴, como una posible diana del miR-223. Entre los posibles genes diana que pudieran afectar a esta vía se encontraba ARNT, un cooperador necesario para la activación transcripcional del AhR¹⁰⁰. De hecho, encontramos múltiples sitios de unión predichos informáticamente del miR-223 3p y 5p sobre la región 3'-UTR de ARNT. La unión de miRNAs a las regiones 3'-UTR de los mRNA es un mecanismo conocido que utilizan estos ARNs pequeños para inhibir la traducción de los mRNA²³³, en lugar de causar su degradación. Nuestros resultados apuntan a este mecanismo para el miR-223 ya que se une a la región 3'-UTR de ARNT (Fig. 15A) y disminuye la cantidad de ésta proteína pero no la de su mRNA (Fig. 15C). La disminución de los niveles proteicos de ARNT en tejidos de AR comparados con los de OA, así como también los genes diana del AhR (CYPs), muestra su posible conexión con la patología (Fig. 17). Además, usando el programa GSEA con los perfiles de expresión de dos estudios independientes en los que caracterizan los MΦ del líquido sinovial¹⁸³ y los BMDC¹⁸² de AR y de OA, también detectamos menores señales de Notch y AhR en las células derivadas de AR. Esto indica que el fenómeno observado no está restringido a nuestra cohorte de pacientes.

Se ha descrito que la ausencia del AhR en MΦ amplifica la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS^{234,235}. Por lo tanto, el AhR puede inducir un programa transcripcional que reprime la respuesta inflamatoria en MΦ. En nuestro sistema la sobreexpresión del miR-223 disminuye los niveles de ARNT, pudiendo reducir la formación del complejo AhR/ARNT, con el consecuente aumento en la generación de IL-6. En condiciones de activación del AhR mediante el ligando BaP, la sobreexpresión del miR-223 impidió la respuesta antiinflamatoria del AhR, lo que aumentó la producción de IL-6, IL-1β y TNFα con respecto a las células que sobreexpresan un plásmido control (Fig. 16). Estos datos indican un bloqueo de la actividad AhR mediado por el

silenciamiento que ejerce miR-223 sobre ARNT. La actuación del AhR en ausencia de ligandos^{234,235}, indica que la vía del AhR es activa de una forma ligando-independiente. Sin embargo, los medios de cultivo pueden estar generando una fuente de ligando continuada²³⁶. Los ligandos endógenos del AhR dependientes del metabolismo del triptófano se activan con estímulos proinflamatorios¹²⁰ y RelB (de la vía NFκB) puede señalizar junto a AhR²³⁷. Esto podría relacionarse con los niveles basales de la activación del AhR en nuestras células. Los diferentes ligandos del AhR tienen diferentes efectos sobre las respuestas celulares debido a las diferentes tasas de metabolización y afinidades que poseen por el AhR; siendo TCDD el menos metabolizable²³⁸ y FICZ el que más afinidad presenta por AhR²³⁹. La expresión constitutiva del AhR en las barreras corporales y la detección de sus ligandos naturales en la piel (generación de FICZ por rayos ultravioleta), intestino (generación de ICZ por crucíferas)²⁴⁰ o pulmones (ITE), se correlaciona con una menor inflamación de los tejidos; involucrando a células inmunes y las propias células de mantenimiento de las barreras¹⁰⁶. El uso de BaP como ligando del AhR e inductor de su señalización permitió observar la correlación positiva entre AhR y Notch3, también observada en las muestras de pacientes (Fig. 20), sugiriendo que la inhibición del AhR contribuye a un bucle de retroalimentación negativa en el que también se reducen los niveles de Notch3^{241,242}, y por tanto, aumentan los del miR-223.

La evidencia indica que la vía AhR/ARNT junto a sus inductores endógenos o exógenos influyen la patología de AR¹⁰⁴, si bien en macrófagos la activación de la vía del AhR tendría una función antiinflamatoria, para evitar la sobreestimulación¹²⁰. Elevados niveles del miR-223 en los MΦ de AR estarían evitando la actividad antiinflamatoria del AhR (Fig. 18), potenciando la producción de IL-6, TNFα o IL-1β, citoquinas críticas en la patología de AR. Aunque no se ha determinado en este estudio, una actividad del miR-223 independiente del AhR/ARNT es posible, ya que la sobreexpresión del miR-223 es suficiente para aumentar los niveles de TNFα e IL-6 (Fig. 16).

El AhR actúa como un mediador antiinflamatorio en MΦ, sin embargo puede promover la diferenciación de linfocitos T naïve a células T_H17¹¹², críticas en el desarrollo de la AR²⁴³, o por el contrario hacia células T_{REG}¹¹¹, que suprimen la enfermedad. La expresión del miR-223 en células T_H17 de pacientes de AR es casi nula⁶⁷, lo que favorecería que la vía del AhR/ARNT indujese la diferenciación hacia T_H17. Sin embargo, miR-223 es necesario en el desarrollo de T_H17 en una fase temprana, al observarse menos células T_H17 en ratones KO para miR-223⁷⁰. Esa expresión temprana del miR-223, se muestra elevada en células naïve de pacientes de AR, lo cual podría estar inhibiendo la capacidad del AhR para generar células Treg⁶⁷ o potenciar la expresión de

IL-17, al reducir los niveles de un regulador negativo de esta citoquina⁷¹. En ese mismo sentido, también se ha encontrado un aumento del miR-223 en el plasma de pacientes de cáncer de pulmón en fumadores²⁴⁴ y en madres fumadoras, asociado a un menor número de células Treg²⁴⁵. Aunque son necesarios más estudios en otros tipos celulares asociados a AR.

En resumen, proponemos un modelo (Fig. 42) en el que una expresión elevada del miR-223 en MΦ, debida a una baja señalización de la ruta de Notch, interferiría en la vía AhR/ARNT, impidiendo la actividad represora de esta vía en la producción de citoquinas proinflamatorias involucradas en la patogenia de la AR, como el TNF α , IL-6 e IL-1 β . Proponemos que la conexión miR-223/AhR aquí identificada, constituye una forma fina de regulación de la actividad del AhR en célula mieloides y soporta conceptualmente el uso de terapias basadas en antagonistas del miR-223 en AR⁶⁹.

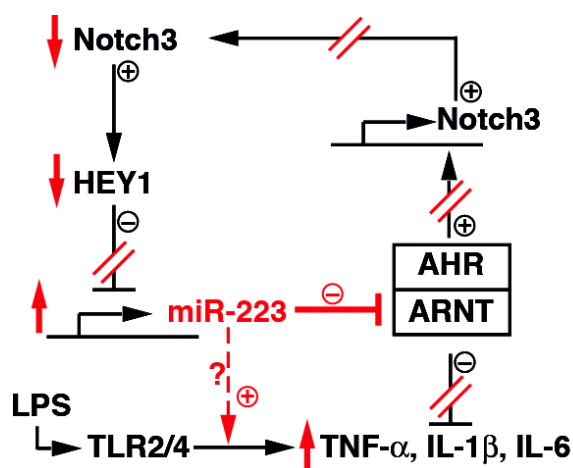


Fig. 42. Mecanismo propuesto de regulación del miR-223 y sus acciones relacionadas (en color rojo) en macrófagos de AR.

2. Mecanismos de inmunosupresión mediados por PD-1 en linfocitos T CD8 humanos.

En este estudio, hemos examinado los efectos del receptor PD-1 sobre las células CD8⁺ humanas. Mediante un análisis de secuenciación masiva de ARN, hemos detectado alteraciones en la expresión de genes mitocondriales. Nuestros resultados muestran como las CD8⁺ que reciben las señales de estimulación en presencia del PD-L1, bloquean el aumento de algunos genes implicados en el mantenimiento de la estructura de las crestas mitocondriales, así como la respiración mitocondrial y la utilización de glucosa. Estos efectos impiden la activación celular, la cual necesita de una profunda reprogramación del metabolismo.

Aunque primeramente PD-1 se describió como un inductor de muerte celular (*Programmed Death-1*)¹²⁹, posteriormente se estableció que no induce apoptosis en linfocitos T²⁴⁶, sino que estaba involucrado en la regulación inmune. Una de las grandes cuestiones al inicio de este estudio era si PD-1 causa inmunosupresión simplemente anulando la señalización del TCR intracelularmente (mediante el reclutamiento de la fosfatasa SHP-2¹⁵⁰) o si por el contrario podría iniciar un programa genético específico que reforzara la inmunosupresión. En soporte de esta última hipótesis, se ha descrito que PD-1 puede inducir la expresión de BATF y así suprimir la activación de las células T²⁴⁷. Para estudiar la respuesta del PD-1, utilizamos linfocitos T CD8⁺ purificados por selección negativa a partir de sangre de donantes sanos. Es necesaria que la unión del PD-L1 a su receptor se produzca en un lugar próximo a la estimulación del TCR para inactivar la señalización de las células T²⁰², de tal manera que el sistema que hemos utilizado mediante APCs artificiales basadas en nanopartículas magnéticas acopladas con anticuerpos agonistas de receptores activadores (CD3 y CD28) e inhibidores (PD-1), intenta mimetizar la señalización de antígeno en presencia del ligando del PD-1, PD-L1. En nuestro modelo experimental hemos obtenido una fuerte inhibición de la proliferación y de los marcadores de activación en células CD8⁺ en presencia del PD-L1 (Fig. 22), indicando que la señalización del PD-1 es activa porque suprime la respuesta de estas células. Estos resultados son similares a los que se producen en las mismas condiciones sobre células CD4⁺¹⁷⁵.

Algunos miRNAs se han mostrado capaces de regular los niveles del PD-1²⁴⁸ o su ligando²⁴⁹. También se han notificado variaciones en los niveles de miRNAs al bloquear la señal del PD-1: descensos de miR-155, miR-23b, miR-21 en macrófagos y células THP-1¹⁴⁰ y aumento de miR-21 en células CD4⁺ de ratón deficientes en PD-1²⁵⁰. Estos resultados sugieren que PD-1 podría estar regulando estos miRNAs de forma directa o indirecta. En nuestro modelo, en el que no bloqueamos la señal del PD-1 sino que la estimulamos, no logramos identificar cambios estadísticamente significativos (FC>2 y FDR<0,05) en la expresión de miRNAs. Pueden existir distintas explicaciones a estos resultados. En algunos casos, los miRNAs identificados en otros estudios han sido determinados en sistemas como modelos animales o líneas celulares que difieren en la variabilidad con respecto a los linfocitos T CD8⁺ purificados de donantes sanos, pese a que todos los ensayos fueron realizados con grupos de donantes para intentar disminuir este factor. Aunque los datos del array no proporcionaron cambios significativos, conociendo que los niveles del miR-223 pueden regular señales inflamatorias en células T y podrían guardar algún tipo de relación con los niveles del PD-L1²⁵¹, se comprobó el nivel de expresión del miR-223 en un experimento independiente. Tampoco observamos

cambios en los niveles del miR-223 por la activación *ex vivo* mediante anti-CD3/CD28 o por la ligación del PD-1 en células T CD8⁺ humanas (Fig. 23). En resumen, nuestros resultados sugieren que los cambios en la expresión de miRNAs inducidos por PD-1, si ocurren, deben ser pequeños y dependientes de otros factores.

Centrándonos en genes codificantes, encontramos una correlación entre los patrones de expresión temporal de cada una de las tres muestras independientes procedentes de grupos de tres donantes cada uno (Fig. 31). Especialmente interesante nos pareció que los datos de expresión génica obtenidos en el RNA-seq indicaran que existen genes diferencialmente regulados entre las células estimuladas con PD-L1 y la ausencia de estímulo, representada en la condición IgG. La ligación del PD-1 genera por tanto una respuesta transcripcional específica en las células primarias T CD8⁺.

También resulta interesante la validación de los genes que aumentan su transcripción en respuesta a PD-1 comparado con los que disminuyen su expresión tras 48h de activación con anti-CD3/CD28 (Fig. 28). Un 20% de estos genes sobreexpresados en la condición de ligación del PD-1 están enriquecidos en vías relacionadas con la organización del citoesqueleto según la *ConsensusPathDB*²⁵². Una organización aberrante del citoesqueleto podría dar lugar a una deficiente sinapsis inmunológica que reduciría la respuesta de las células T²⁵³. Estamos estudiando la posible implicación de algunos de estos genes en su relación con la inhibición de las células T, cuya función no está descrita hasta la fecha.

La proliferación, la expresión de IFN γ y el incremento de expresión del PD-1 que se generan en las células T CD8⁺ como consecuencia de la estimulación con anti-CD3/CD28 comienzan a ser patentes tras las 24-48h. Tras la activación del PD-1 se pueden producir metilaciones persistentes en el tiempo que dificultan revertir el efecto causado por el PD-1²⁵⁴. Por eso, nos pareció adecuado estudiar los cambios transcripcionales tempranos inducidos por activación del PD-1 como un medio de identificar mecanismos de señalización temprana inducidos por este receptor. Al igual que otros estudios^{175,198,247}, observamos que el bloqueo de la transcripción de los genes es rápido en el tiempo. Sin embargo, no identificamos genes inducidos por la ligación del PD-1 a las 6h de estimulación. En esos mismos estudios, detectan BATF o CPT1A, específicamente inducidos por el PD-1 a tiempos más largos (>96 horas); mientras que en nuestras validaciones en condiciones del PD-1 activado no observamos a BATF o CPT1A a niveles tan elevados a las 48 horas, lo que podría sugerir una regulación dependiente del tiempo.

Para tener una visión global de los genes que pueden estar impidiendo la correcta activación de las $hCD8^+$ en presencia de estímulo CD3/CD28 y PD-L1, utilizamos herramientas informáticas para determinar patrones de expresión temporal en genes desregulados, y agrupar los patrones semejantes según sus funciones. La expresión de los genes que codifican para proteínas mitocondriales implicadas en estructura, cadena respiratoria de electrones, ADN mitocondrial, biogénesis y metabolismo de un carbono se encontraron en menores niveles en activación del PD-1 con respecto a las células activadas, en las cuales se aprecia un incremento dependiente del tiempo de estimulación. Las rutas metabólicas mitocondriales se han mostrado esenciales para una correcta activación linfocítica¹⁶⁷, por lo que el bloqueo de su función mediante la señalización del PD-1 podría ser clave para limitar sus respuestas. Se han reportado aumentos de la masa mitocondrial en células T $CD8^+$ de ratón exhaustas¹⁷⁷, o por el contrario, menor número de mitocondrias en las $CD8^+$ que infiltran los tumores¹⁷⁸. En nuestro modelo observamos una reducción en la masa mitocondrial estadísticamente significativa tras la estimulación con PD-L1 comparado con las células estimuladas con anti-CD3/CD28 a las 48h en todos los abordajes utilizados (Fig. 34); incluso en la cantidad de copias de mtDNA, donde las diferencias de expresión son pequeñas debido a que se cuantifica de forma directa, es decir, sin paso de amplificación previo como en la RT-qPCR. La actividad mitocondrial se asocia a la diferencia de potencial de membrana. Se ha observado la disminución de la actividad mitocondrial en las células exhaustas¹⁷⁷ y en las que infiltran los tumores¹⁷⁸, dos situaciones en las que podría intervenir PD-1. En esa relación que puede existir entre la actividad mitocondrial y PD-1, Honjo et al.¹⁷⁶ y Bengsh et al.¹⁷⁷ observan que el bloqueo la señal del PD-1 aumenta la actividad mitocondrial. Sin embargo, Scharping et al.²⁵⁵ determinaron que la disminución de masa y potencial de membrana mitocondrial es independiente del PD-1 y se debe al microambiente tumoral. En nuestro modelo, hemos observado menores niveles de actividad mitocondrial en las células sin estímulo (IgG) o en las estimuladas con PD-L1. Dado que nuestro sistema tiene pocas variables, los resultados sugieren que la vía PD-1/PD-L1 es capaz de disminuir la actividad mitocondrial de forma directa en células T $CD8^+$ humanas. Esto ocurre sin perjuicio de que en sistemas más complejos puedan existir mecanismos adicionales.

La morfología externa mitocondrial no se vio afectada por la estimulación del PD-1, observando una circularidad comparable en todas las condiciones (Fig. 35). Genes que gobiernan la fusión o fisión mitocondrial, como OPA o DRP, tampoco se vieron desregulados por la estimulación con PD-L1 (Fig. 32), lo que concuerda con la ausencia de cambios en la circularidad mitocondrial. Al igual que otros estudios²⁵⁵, tampoco

observamos un aumento de la mitofagia en las imágenes de microscopía electrónica, ni en los genes relacionados con ella. Mediante microscopía electrónica se observan defectos en la organización de las crestas mitocondriales cuando el PD-1 es activado en las células hCD8⁺. El número y la longitud de las crestas mitocondriales disminuyó tras la estimulación con PD-L1 comparado con las células activadas con CD3/CD28, en el mismo sentido que las células sin estímulo (Fig. 36). Los diferentes complejos mitocondriales se sitúan en las crestas de las mitocondrias, y se pueden agrupar formando supercomplejos (la unión de complejos I/III, complejos I/III/IV y complejos III/IV). Por lo que una menor superficie de crestas disminuye la unión y estabilidad de los supercomplejos²⁵⁶, pudiendo disminuir la eficiencia de la cadena de transporte de electrones. También encontramos diferencias significativas en genes y proteínas relacionados con la membrana mitocondrial. Tras el contacto con el PD-L1 se produce un bloqueo de la expresión de algunas de las proteínas que anclan las crestas mitocondriales a la membrana de la mitocondria (complejos MICOS), como CHCHD3 y CHCHD10. Una menor producción de estas proteínas pueden estar propiciando la desestructuración de las crestas^{257,258}, y por lo tanto, disminuir la respiración mitocondrial²⁵⁹ afectando negativamente a su capacidad para generar energía e intermediarios biosintéticos necesarios para la activación de las células CD8⁺. Otras proteínas bloqueadas por PD-1 no relacionadas con MICOS, como MTFR2, han sido descritas fundamentales para mantener la respiración mitocondrial²⁰⁹. Que no existan diferencias en cuanto a los niveles proteicos de los complejos mitocondriales generadores del potencial de membrana, pero sí sobre proteínas relacionadas con los complejos MICOS (Fig. 33), indica que la señalización del PD-1 puede reprimir específicamente a la formación de estructuras que soportan los supercomplejos que forman la cadena de transporte de electrones, impidiendo su actuación eficiente. Consecuentemente la $\Delta\Psi_m$ fue menor tras la estimulación con PD-L1, comparado con las células activadas, e idéntico al de células sin estímulo (IgG) (Fig. 37). En esta misma línea, Bensch et al. ven enriquecidos genes relacionados con OXPHOS, ciclo del citrato, metabolismo de ácidos grasos y metabolismo de aminoácidos en células CD8⁺ exhaustas tempranas comparadas con células CD8⁺ que reaccionan frente a una infección aguda. Sin embargo, también determinan una menor respiración y actividad mitocondrial en las células exhaustas¹⁷⁷, por lo que existe un salto entre el aumento de genes relacionados con el metabolismo mitocondrial que no se traduce en una mayor actividad de las mitocondrias. Lo que podría indicar un bloqueo mitocondrial no debido a genes involucrados en su función, sino quizás a su organización; como nosotros apuntamos.

Las proteínas bloqueadas por PD-1 que se sitúan en los complejos MICOS, actúan de forma conjunta, donde la eliminación de alguna de ellas afecta a la función de todo el complejo^{172,258} o incluso desestabilizan a otras proteínas cercanas²⁵⁷. Es por ello, que la sobreexpresión de una única proteína perteneciente a estos complejos (CHCHD3 o CHCHD10) no tuvo efecto sobre las hCD8⁺ en la $\Delta\Psi_m$ ni sobre la expresión de marcadores de activación celular (Fig. 41).

A nivel molecular hemos visto como la ausencia de estímulo o la activación de PD-1 bloquea la utilización de glucosa y la respiración mitocondrial por parte de las células CD8⁺. Con los datos obtenidos de la respiración mitocondrial (Fig. 38) se puede hallar el porcentaje del incremento entre la respiración celular (OCR) basal y su máximo (%SRC), el cual se correlaciona con el porcentaje de los complejos mitocondriales de repuesto. Estudios en células CD4⁺ demuestran como este reservorio aumenta cuando se estimula PD-1¹⁷⁵. Sin embargo, disminuyen en células CD8⁺ exhaustas¹⁷⁷. En nuestro modelo no observamos diferencias en el %SRC, lo que indica que aunque la capacidad respiratoria de las células CD8⁺ estimuladas con IgG o PD-L1 sea mucho menor, éstas siguen conservando la proporcionalidad extra mitocondrial para producir energía, posiblemente necesaria para la supervivencia celular¹⁷⁵. Razonablemente, el incremento de la respiración mitocondrial debido al mayor número de crestas mitocondriales se ve reflejado en la mayor capacidad de reserva (SRC) que poseen las células activadas, haciendo posible una respuesta adecuada frente a los estímulos antigénicos. Como ya hemos indicado, las células T activadas suelen usar glucosa para sus necesidades energéticas. En nuestro modelo, PD-1 podría estar bloqueando la formación de supercomplejos mitocondriales y estar contribuyendo a que la obtención preferente de energía sea a partir de glucosa pudiendo dar una explicación a que las células exhaustas sean más sensibles a la inhibición de la utilización de glucosa²⁶⁰, puesto que el uso de OXPHOS no sería tan accesible. De nuevo, en células CD4⁺, PD-1 actúa de manera contraria al potenciar la utilización de OXPHOS sobre el uso de glucosa¹⁷⁵.

Los resultados aquí descritos no sólo aumentan nuestro conocimiento sobre los mecanismos inmunoreguladores de PD-1, sino que además pueden tener relevancia traslacional. Los anticuerpos bloqueantes del eje PD-1/PD-L1 se ha convertido en uno de los tratamientos más revolucionarios en oncología clínica. No obstante, es necesario, por una parte, aumentar la eficacia de dichos tratamientos y, por otra, encontrar biomarcadores que distingan pacientes respondedores de no respondedores a la terapia. Nuestros hallazgos demostrando que la ligación del PD-1 en células citotóxicas humanas modifica la actividad mitocondrial puede ser relevante en ambas facetas. Identificar parámetros específicos a nivel mitocondrial de células CD8⁺ que infiltran tumores antes y

después del tratamiento podría constituir un biomarcador predictivo o indicativo de la eficacia del tratamiento. Reactivar la actividad mitocondrial podría abrir una nueva vía de actuación para las células CD8⁺ que mejore la actividad de los anticuerpos anti-PD-1 en terapia oncológica. Estos aspectos necesitan una mayor comprensión y la obtención de evidencias preclínicas, pero estudios recientes demuestran como la actuación sobre las mitocondrias en células CD8⁺ de ratón es capaz de reducir la progresión tumoral¹⁷⁶.

En resumen, nuestros resultados han descubierto una nueva función del PD-1 para producir tolerancia periférica de las células T CD8⁺ humanas a través de impedir la función mitocondrial (Fig. 43). Si bien es cierto, que no hemos determinado la causa de ese bloqueo, esta descripción nos pone sobre la pista de la búsqueda de factores de transcripción comunes en la regulación de la expresión de los genes mitocondriales bloqueados en la actuación del PD-1. La asociación entre complejos MICOS, crestas mitocondriales y supercomplejos en células T CD8⁺ exhaustas podría tener implicaciones en terapias para reactivar la respuesta efectora frente a tumores.

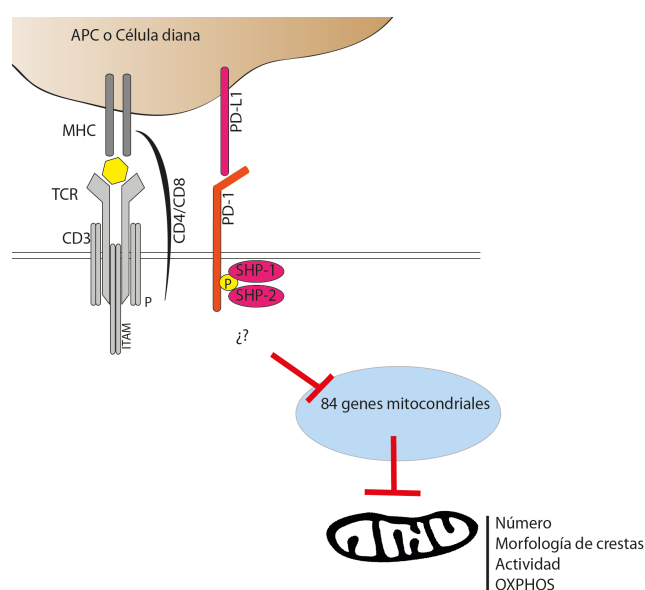


Fig. 43. Esquema resumido de las implicaciones del bloqueo de la expresión de genes mitocondriales producido por el receptor PD-1.

CONCLUSIONES

1. Las células CD14⁺ del líquido sinovial de pacientes de AR se caracterizan por sobreexpresar el miR-223, no observado en las células CD14⁺ aisladas de pacientes con OA.
2. La activación de la vía de Notch reprime la expresión del miR-223 en monocitos y macrófagos. Los niveles de Notch3 y de genes diana de la vía de Notch son menores en los MΦ de pacientes de AR, lo cual sugiere que el aumento de la expresión del miR-223 en los MΦ puede ser consecuencia de una menor señalización de Notch3.
3. El miR-223 reprime la traducción del mRNA de la proteína ARNT, lo que disminuye la actividad del factor de transcripción AhR. Los niveles de ARNT y los de genes diana de la vía AhR/ARNT están disminuidos en el tejido sinovial de pacientes con AR, sugiriendo que la conexión miR-223/ARNT es relevante en el contexto patológico.
4. El aumento en los niveles del miR-223 regula la función efectora de los MΦ al aumentar la producción de las citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1β y TNFα), relevantes en la progresión de la AR. El aumento de expresión de IL-1β y TNFα inducido por el miR-223 es dependiente de su actividad inhibitoria sobre la vía del AhR.
5. La unión del PD-1 con su ligando PD-L1 induce un programa transcripcional específico en células CD8⁺ humanas, diferente al del estado quiescente.
6. Los análisis bioinformáticos indican que PD-1 afecta principalmente a genes relacionados con el metabolismo, la estructura y la función mitocondrial.
7. La señalización del PD-1 bloquea el aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas mitocondriales, afectando negativamente al número de mitocondrias y a su actividad. El menor número de proteínas formadoras de los complejos MICOS puede causar la desorganización de las crestas mitocondriales.
8. Los estudios metabólicos realizados indican que la señalización del PD-1 evita el cambio del metabolismo mitocondrial, asociado con la activación linfocitaria.
9. Nuestro modelo sugiere que la señalización de PD-1 gobierna la activación de las células hCD8⁺ a través de la disfunción mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper, Max D. Peterson, Raymond D. A. Good, R. A. Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature* **205**, 143–146 (1965).
2. Gitlin, A. D. & Nussenzweig, M. C. Immunology: Fifty years of B lymphocytes. *Nature* **517**, 139–141 (2015).
3. Paul, W. E., Cohn, Z. A., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. Van, Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M. & Galanos, C. Bridging innate and adaptive immunity. *Cell* **147**, 1212–5 (2011).
4. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
5. Sell, S. Cancer immunotherapy: Breakthrough or ‘deja vu, all over again’? *Tumor Biol.* **39**, 101042831770776 (2017).
6. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Innate Immunity. Molecular Biology of the Cell.* (Garland Science, 2002).
7. Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J. A., Vogel, S. N. & Wynn, T. A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
8. Guillems, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 94–108 (2014).
9. O’Konek, J. J., Terabe, M. & Berzofsky, J. A. The Role of NKT Cells in the Immune Regulation of Neoplastic Disease. *Innate Immune Regul. Cancer Immunother.* (Springer, New York, NY) 7–21 (2012).
10. Holtmeier, W. & Kabelitz, D. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem. Immunol. Allergy* **86**, 151–83 (2005).
11. Schwartz, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**, 1349–56 (1990).
12. Weng, N.-P., Akbar, A. N. & Goronzy, J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* **30**, 306–12 (2009).
13. Wang, B., Maile, R., Greenwood, R., Collins, E. J. & Frelinger, J. A. Naive CD8+ T Cells Do Not Require Costimulation for Proliferation and Differentiation into Cytotoxic Effector Cells. *J. Immunol.* **164**, 1216–1222 (2000).
14. Del Prete, G. The Concept of Type-1 and Type-2 Helper T Cells and Their Cytokines in Humans. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 427–455 (1998).
15. Zambrano-Zaragoza, J. F., Romo-Martínez, E. J., Durán-Avelar, M. de J., García-Magallanes, N. & Vibanco-Pérez, N. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int. J. Inflam.* **2014**, 651503 (2014).
16. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *The Adaptive Immune System.* (Garland Science, 2009).

17. Golubovskaya, V. & Wu, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **8**, 36 (2016).
18. Cullen, S., Brunet, M. & Martin, S. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.* **17**, 616–623 (2010).
19. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Uchida, Y. & Toge, T. The role of Fas ligand and transforming growth factor in tumor progression. *Cancer* **100**, 2281–2291 (2004).
20. Prévost-Blondel, A., Roth, E., Rosenthal, F. M. & Pircher, H. Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J. Immunol.* **164**, 3645–51 (2000).
21. Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 24–35 (2014).
22. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
23. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Self-tolerance and its loss.* (Garland Science, 2001).
24. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685–711 (2003).
25. Fife, B. T. & Bluestone, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* **224**, 166–182 (2008).
26. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–42 (2013).
27. Mackay, I. R. Tolerance and autoimmunity. *West. J. Med.* **174**, 118–123 (2001).
28. Ceccarelli, F., Agmon-Levin, N. & Perricone, C. Genetic Factors of Autoimmune Diseases. *J. Immunol. Res.* **2016**, 3476023 (2016).
29. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T. & Minato, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12293–12297 (2002).
30. Bracken, C. P., Scott, H. S. & Goodall, G. J. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 719–732 (2016).
31. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-)*. **294**, 858–862 (2001).
32. Ørom, U. A., Nielsen, F. C., Lund, A. H., Kaspar, R. L., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Drost, J., Griekspoor, A. & al., et. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell* **30**, 460–471 (2008).

33. Neilsen, C. T., Goodall, G. J. & Bracken, C. P. IsomiRs – the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet.* **28**, 544–549 (2012).
34. Mehta, A. & Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 279–294 (2016).
35. Chen, C.-Z., Schaffert, S., Fragoso, R. & Loh, C. Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective. *Immunol. Rev.* **253**, 112–28 (2013).
36. Bellucci, E., Terenzi, R., Paglia, G. M. C. La, Gentileschi, S., Tripoli, A., Tani, C. & Alunno, A. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **34**, 793–801 (2016).
37. Silman, A. J. & Pearson, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**, S265-72 (2002).
38. Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **388**, 2023–2038 (2016).
39. Tan, E. M. & Smolen, J. S. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *J. Exp. Med.* **213**, 1937–50 (2016).
40. Kochi, Y., Suzuki, A. & Yamamoto, K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: A current review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 254–262 (2014).
41. Hensvold, A. H., Reynisdottir, G. & Catrina, A. I. From Citrullination to Specific Immunity and Disease in Rheumatoid Arthritis. in *Protein Deimination in Human Health and Disease* 25–40 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-8317-5_2
42. Klareskog, L., Rönnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L. & Alfredsson, L. Immunity to Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 651–675 (2008).
43. Smith, M. D. The normal synovium. *Open Rheumatol. J.* **5**, 100–6 (2011).
44. Mellado, M., Martínez-Muñoz, L., Cascio, G., Lucas, P., Pablos, J. L. & Rodríguez-Frade, J. M. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **6**, 384 (2015).
45. Catrina, A. I., Ytterberg, A. J., Reynisdottir, G., Malmström, V. & Klareskog, L. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 645–653 (2014).
46. Mottonen, M. Interleukin-10 inhibits the capacity of synovial macrophages to function as antigen-presenting cells. *Rheumatology* **37**, 1207–1214 (1998).
47. Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H. & Carr, A. J. Osteoarthritis. *Lancet* **386**, 376–387 (2015).
48. Laurent, L., Anquetil, F., Clavel, C., Ndongo-Thiam, N., Offer, G., Miossec, P., Pasquali, J.-L., Sebbag, M. & Serre, G. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1425–1431 (2015).

49. Kinne, R. W., Stuhlmüller, B. & Burmester, G.-R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 224 (2007).
50. Udalova, I. A., Mantovani, A. & Feldmann, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 472–485 (2016).
51. Salehi, E., Eftekhari, R., Oraei, M., Gharib, A. & Bidad, K. MicroRNAs in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **34**, 615–628 (2015).
52. Chen, X.-M., Huang, Q.-C., Yang, S.-L., Chu, Y.-L., Yan, Y.-H., Han, L., Huang, Y. & Huang, R.-Y. Role of Micro RNAs in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Novel Perspectives Based on Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)*. **94**, e1326 (2015).
53. Kurowska-Stolarska, M., Alivernini, S., Ballantine, L. E., Asquith, D. L., Millar, N. L., Gilchrist, D. S., Reilly, J., Ierna, M., Fraser, A. R., Stolarski, B., McSharry, C., Hueber, A. J., Baxter, D., Hunter, J., Gay, S., Liew, F. Y. & McInnes, I. B. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11193–8 (2011).
54. Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M. & Asahara, H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* **58**, 1284–1292 (2008).
55. Aziz, F. The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. *Cell. Immunol.* **303**, 1–6 (2016).
56. Sugatani, T. & Hruska, K. A. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *J. Biol. Chem.* **284**, 4667–78 (2009).
57. Sun, W., Shen, W., Yang, S., Hu, F., Li, H. & Zhu, T.-H. miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β . *Cell Res.* **20**, 1158–1169 (2010).
58. Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C. & Bozzoni, I. A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP β Regulates Human Granulopoiesis. *Cell* **123**, 819–831 (2005).
59. Haneklaus, M., Gerlic, M., O'Neill, L. A. J. & Masters, S. L. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J. Intern. Med.* **274**, 215–226 (2013).
60. Johnnidis, J. B., Harris, M. H., Wheeler, R. T., Stehling-Sun, S., Lam, M. H., Kirak, O., Brummelkamp, T. R., Fleming, M. D. & Camargo, F. D. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* **451**, 1125–1129 (2008).
61. Bauernfeind, F., Rieger, A., Schildberg, F. A., Knolle, P. A., Schmid-Burgk, J. L. & Hornung, V. NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223. *J. Immunol.* **189**, 4175–81 (2012).
62. Zhuang, G., Meng, C., Guo, X., Cheruku, P. S., Shi, L., Xu, H., Li, H., Wang, G., Evans, A. R., Safe, S., Wu, C. & Zhou, B. A Novel Regulator of Macrophage Activation: miR-223 in Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Circulation* **125**, 2892–2903 (2012).

63. Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., Song, Y., Lai, L., Han, Q., Cao, X. & Wang, Q. Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 β Production in Macrophages by Targeting STAT3. *PLoS One* **7**, e42971 (2012).
64. Li, T., Morgan, M. J., Choksi, S., Zhang, Y., Kim, Y.-S. & Liu, Z. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat. Immunol.* **11**, 799–805 (2010).
65. Lawrence, T., Bebień, M., Liu, G. Y., Nizet, V. & Karin, M. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* **434**, 1138–1143 (2005).
66. Li, Q., Lu, Q., Bottero, V., Estepa, G., Morrison, L., Mercurio, F. & Verma, I. M. Enhanced NF-kappaB activation and cellular function in macrophages lacking IkappaB kinase 1 (IKK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12425–30 (2005).
67. Fulci, V., Scappucci, G., Sebastiani, G. D., Giannitti, C., Franceschini, D., Meloni, F., Colombo, T., Citarella, F., Barnaba, V., Minisola, G., Galeazzi, M. & Macino, G. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* **71**, 206–211 (2010).
68. Shibuya, H., Nakasa, T., Adachi, N., Nagata, Y., Ishikawa, M., Deie, M., Suzuki, O. & Ochi, M. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod. Rheumatol.* **23**, 674–685 (2013).
69. Li, Y.-T., Chen, S.-Y., Wang, C.-R., Liu, M.-F., Lin, C.-C., Jou, I.-M., Shiao, A.-L. & Wu, C.-L. Brief Report: Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223. *Arthritis Rheum.* **64**, 3240–3245 (2012).
70. Satoorian, T., Li, B., Tang, X., Xiao, J., Xing, W., Shi, W., Lau, K.-H. W., Baylink, D. J. & Qin, X. MicroRNA223 promotes pathogenic T-cell development and autoimmune inflammation in central nervous system in mice. *Immunology* **148**, 326–338 (2016).
71. Schaefer, J. S., Montufar-Solis, D., Vigneswaran, N. & Klein, J. R. Selective Upregulation of microRNA Expression in Peripheral Blood Leukocytes in IL-10-/- Mice Precedes Expression in the Colon. *J. Immunol.* **187**, 5834–5841 (2011).
72. Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, J.-C., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A. & Ogier-Denis, E. Identification of Restricted Subsets of Mature microRNA Abnormally Expressed in Inactive Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* **5**, e13160 (2010).
73. Yuan, J. S., Kousis, P. C., Suliman, S., Visan, I. & Guidos, C. J. Functions of Notch Signaling in the Immune System: Consensus and Controversies. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 343–365 (2010).
74. Iso, T., Kedes, L. & Hamamori, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **194**, 237–55 (2003).
75. Ayaz, F. & Osborne, B. A. Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front. Oncol.* **4**, 345 (2014).

76. Wu, J. & Bresnick, E. H. Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 477–85 (2007).
77. Bellavia, D., Checquolo, S., Campese, A. F., Felli, M. P., Gulino, A. & Screpanti, I. Notch3: from subtle structural differences to functional diversity. *Oncogene* **27**, 5092–5098 (2008).
78. Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C. & Lendahl, U. The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* **126**, 3925–35 (1999).
79. von Grabowiecki, Y., Licon, C., Palamiuc, L., Abreu, P., Vidimar, V., Coowar, D., Mellitzer, G. & Gaiddon, C. Regulation of a Notch3-Hes1 Pathway and Protective Effect by a Tocopherol-Omega Alkanol Chain Derivative in Muscle Atrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **352**, 23–32 (2014).
80. Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H. & Honjo, T. Notch1 and Notch3 Instructively Restrict bFGF-Responsive Multipotent Neural Progenitor Cells to an Astroglial Fate. *Neuron* **29**, 45–55 (2001).
81. Song, Y., Zhang, Y., Jiang, H., Zhu, Y., Liu, L., Feng, W., Yang, L., Wang, Y. & Li, M. Activation of Notch3 promotes pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation via Hes1/p27Kip1 signaling pathway. *FEBS Open Bio* **5**, 656–60 (2015).
82. Bray, S. J. Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 722–735 (2016).
83. Yabe, Y., Matsumoto, T., Tsurumoto, T. & Shindo, H. Immunohistological localization of Notch receptors and their ligands Delta and Jagged in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J. Orthop. Sci.* **10**, 589–594 (2005).
84. Ishii, H., Nakazawa, M., Yoshino, S.-I., Nakamura, H., Nishioka, K. & Nakajima, T. Expression of Notch homologues in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatol. Int.* **21**, 10–14 (2001).
85. Nakazawa, M., Ishii, H., Aono, H., Takai, M., Honda, T., Aratani, S., Fukamizu, A., Nakamura, H., Yoshino, S.-I., Kobata, T., Nishioka, K. & Nakajima, T. Role of notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **44**, 1545–1554 (2001).
86. Park, J.-S., Kim, S.-H., Kim, K., Jin, C.-H., Choi, K. Y., Jang, J., Choi, Y., Gwon, A.-R., Baik, S.-H., Yun, U. J., Chae, S. Y., Lee, S., Kang, Y. M., Lee, K. C., Arumugam, T. V., Mattson, M. P., Park, J. H. & Jo, D.-G. Inhibition of Notch signalling ameliorates experimental inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 267–274 (2015).
87. Ruan, Z., Fu, X., Li, W., Ye, J., Wang, R. & Zhu, L. Effect of notch1,2,3 genes silencing on NF-κB signaling pathway of macrophages in patients with atherosclerosis. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 666–673 (2016).
88. Monsalve, E., Pérez, M. A., Rubio, A., Ruiz-Hidalgo, M. J., Baladrón, V., García-Ramírez, J. J., Gómez, J. C., Laborda, J. & Díaz-Guerra, M. J. M. Notch-1 Up-Regulation and Signaling following Macrophage Activation Modulates Gene Expression Patterns Known to Affect Antigen-Presenting Capacity and Cytotoxic Activity. *J. Immunol.* **176**, 5362–5373 (2006).

89. Shang, Y., Smith, S. & Hu, X. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein Cell* **7**, 159–74 (2016).
90. Foldi, J., Chung, A. Y., Xu, H., Zhu, J., Outtz, H. H., Kitajewski, J., Li, Y., Hu, X. & Ivashkiv, L. B. Autoamplification of Notch signaling in macrophages by TLR-induced and RBP-J-dependent induction of Jagged1. *J. Immunol.* **185**, 5023–31 (2010).
91. Palaga, T., Buranaruk, C., Rengpipat, S., Fauq, A. H., Golde, T. E., Kaufmann, S. H. E. & Osborne, B. A. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur. J. Immunol.* **38**, 174–183 (2008).
92. Fung, E., Tang, S.-M. T., Canner, J. P., Morishige, K., Arboleda-Velasquez, J. F., Cardoso, A. A., Carlesso, N., Aster, J. C. & Aikawa, M. Delta-Like 4 Induces Notch Signaling in Macrophages. *Circulation* **115**, 2948–2956 (2007).
93. Zhang, Q., Wang, C., Liu, Z., Liu, X., Han, C., Cao, X. & Li, N. Notch Signal Suppresses Toll-like Receptor-triggered Inflammatory Responses in Macrophages by Inhibiting Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2-mediated Nuclear Factor κ B Activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 6208–6217 (2012).
94. Xu, J., Chi, F., Guo, T., Punj, V., Lee, W. N. P., French, S. W. & Tsukamoto, H. Notch reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation. *J. Clin. Invest.* **125**, 1579–90 (2015).
95. Wang, Y.-C., He, F., Feng, F., Liu, X.-W., Dong, G.-Y., Qin, H.-Y., Hu, X.-B., Zheng, M.-H., Liang, L., Feng, L., Liang, Y.-M. & Han, H. Notch Signaling Determines the M1 versus M2 Polarization of Macrophages in Antitumor Immune Responses. *Cancer Res.* **70**, 4840–9 (2010).
96. Hu, X., Chung, A. Y., Wu, I., Foldi, J., Chen, J., Ji, J. D., Tateya, T., Kang, Y. J., Han, J., Gessler, M., Kageyama, R. & Ivashkiv, L. B. Integrated Regulation of Toll-like Receptor Responses by Notch and Interferon- γ Pathways. *Immunity* **29**, 691–703 (2008).
97. Ko, C.-I., Fan, Y., de Gannes, M., Wang, Q., Xia, Y. & Puga, A. Repression of the Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required to Maintain Mitotic Progression and Prevent Loss of Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **34**, 2825–2839 (2016).
98. Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. & Kato, S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* **423**, 545–550 (2003).
99. Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Ponten, F. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80-.). **347**, 1260419–1260419 (2015).
100. Nguyen, N. T., Hanieh, H., Nakahama, T. & Kishimoto, T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int. Immunol.* **25**, 335–343 (2013).

101. Mandl, M. & Depping, R. Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1 β): is it a rare exception? *Mol. Med.* **20**, 215–20 (2014).
102. Murray, I. A., Patterson, A. D. & Perdew, G. H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 801–14 (2014).
103. Huang, G. & Elferink, C. J. A Novel Nonconsensus Xenobiotic Response Element Capable of Mediating Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Gene Expression. *Mol. Pharmacol.* **81**, 338–347 (2012).
104. Nguyen, N. T., Nakahama, T., Nguyen, C. H., Tran, T. T., Le, V. S., Chu, H. H. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor antagonism and its role in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Pharmacol.* **7**, 29–35 (2015).
105. Kobayashi, S., Okamoto, H., Iwamoto, T., Toyama, Y., Tomatsu, T., Yamanaka, H. & Momohara, S. A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **47**, 1317–1322 (2008).
106. Stockinger, B., Meglio, P. Di, Gialitakis, M. & Duarte, J. H. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 403–432 (2014).
107. Nakahama, T., Kimura, A., Nguyen, N. T., Chinen, I., Hanieh, H., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 14222–14227 (2011).
108. Duarte, J. H., Di Meglio, P., Hirota, K., Ahlfors, H. & Stockinger, B. Differential Influences of the Aryl Hydrocarbon Receptor on Th17 Mediated Responses in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**, e79819 (2013).
109. Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorp, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C. & Stockinger, B. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106–109 (2008).
110. Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M. & Weiner, H. L. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **453**, 65–71 (2008).
111. Quintana, F. J., Murugaiyan, G., Farez, M. F., Mitsdoerffer, M., Tupkhu, A.-M., Burns, E. J. & Weiner, H. L. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20768–73 (2010).
112. Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9721–6 (2008).
113. Nguyen, N. T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19961–6 (2010).
114. Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* **206**, 2027–35 (2009).

115. Sekine, H., Mimura, J., Oshima, M., Okawa, H., Kanno, J., Igarashi, K., Gonzalez, F. J., Ikuta, T., Kawajiri, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 6391–400 (2009).
116. Masuda, K., Kimura, A., Hanieh, H., Nguyen, N. T., Nakahama, T., Chinen, I., Ootoy, Y., Murotani, T., Yamatodani, A. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. *Int. Immunol.* **23**, 637–45 (2011).
117. Jaguin, M., Fardel, O. & Lecureur, V. Exposure to diesel exhaust particle extracts (DEPe) impairs some polarization markers and functions of human macrophages through activation of AhR and Nrf2. *PLoS One* **10**, e0116560 (2015).
118. Huai, W., Zhao, R., Song, H., Zhao, J., Zhang, L., Zhang, L., Gao, C., Han, L. & Zhao, W. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. **5**, 4738 (2014).
119. Nguyen, N. T., Nakahama, T., Le, D. H., Van Son, L., Chu, H. H. & Kishimoto, T. Aryl Hydrocarbon Receptor and Kynurenine: Recent Advances in Autoimmune Disease Research. *Front. Immunol.* **5**, 551 (2014).
120. Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M. T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Biccato, S., Mazza, E. M. C., Macchiarulo, A., Vacca, C., Iannitti, R., Tissi, L., Volpi, C., Belladonna, M. L., Orabona, C., Bianchi, R., Lanz, T. V., Platten, M., Della Fazio, M. A., Piobbico, D., Zelante, T., Funakoshi, H., Nakamura, T., Gilot, D., Denison, M. S., Guillemin, G. J., DuHadaway, J. B., Prendergast, G. C., Metz, R., Geffard, M., Boon, L., Pirro, M., Iorio, A., Veyret, B., Romani, L., Grohmann, U., Fallarino, F. & Puccetti, P. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* **511**, 184–90 (2014).
121. Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S. & Makishima, M. The Aryl Hydrocarbon Receptor Activator Benzo[a]pyrene Enhances Vitamin D3 Catabolism in Macrophages. *Toxicol. Sci.* **109**, 50–58 (2009).
122. Kostoglou-Athanassiou, I., Athanassiou, P., Lyraki, A., Raftakis, I. & Antoniadis, C. Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **3**, 181–7 (2012).
123. Lahoti, T. S., Boyer, J. A., Kusnadi, A., Muku, G. E., Murray, I. A. & Perdew, G. H. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Synergistically Induces Lipopolysaccharide-Mediated Expression of Proinflammatory Chemokine (c-c motif) Ligand 20. *Toxicol. Sci.* **148**, 229–240 (2015).
124. Monteiro, P., Gilot, D., Le Ferrec, E., Lecureur, V., N'diaye, M., Le Vee, M., Podechard, N., Pouponnot, C. & Fardel, O. AhR- and c-maf-dependent induction of β 7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 442–448 (2007).
125. Marrack, P., Kappler, J. & Kotzin, B. L. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat. Med.* **7**, 899–905 (2001).
126. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
127. Huse, M. The T-cell-receptor signaling network. *J. Cell Sci.* **122**, 1269–1273 (2009).

128. Pollizzi, K. N. & Powell, J. D. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 435–446 (2014).
129. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–95 (1992).
130. Thibult, M.-L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B. & Olive, D. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int. Immunol.* **25**, 129–137 (2013).
131. Gordon, S. R., Maute, R. L., Dulken, B. W., Hutter, G., George, B. M., McCracken, M. N., Gupta, R., Tsai, J. M., Sinha, R., Corey, D., Ring, A. M., Connolly, A. J. & Weissman, I. L. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **545**, 495–499 (2017).
132. Norris, S., Coleman, A., Kuri-Cervantes, L., Bower, M., Nelson, M. & Goodier, M. R. PD-1 Expression on Natural Killer Cells and CD8⁺ T Cells During Chronic HIV-1 Infection. *Viral Immunol.* **25**, 329–332 (2012).
133. MacFarlane, A. W., Jillab, M., Plimack, E. R., Hudes, G. R., Uzzo, R. G., Litwin, S., Dulaimi, E., Al-Saleem, T., Campbell, K. S. & Campbell, K. S. PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 320–31 (2014).
134. Lim, T. S., Chew, V., Sieow, J. L., Goh, S., Yeong, J. P.-S., Soon, A. L. & Ricciardi-Castagnoli, P. PD-1 expression on dendritic cells suppresses CD8(+) T cell function and antitumor immunity. *Oncoimmunology* **5**, e1085146 (2016).
135. Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. & Honjo, T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**, 765–772
136. Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T. & Honjo, T. IFN- Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. *J. Immunol.* **186**, 2772–2779 (2011).
137. Austin, J. W., Lu, P., Majumder, P., Ahmed, R. & Boss, J. M. STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF Regulate PD-1 through Multiple Novel Regulatory Regions in Murine T Cells. *J. Immunol.* **192**, 4876–4886 (2014).
138. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–99 (2015).
139. Oestreich, K. J., Yoon, H., Ahmed, R. & Boss, J. M. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J. Immunol.* **181**, 4832–9 (2008).
140. Staron, M. M., Gray, S. M., Marshall, H. D., Parish, I. A., Chen, J. H., Perry, C. J., Cui, G., Li, M. O. & Kaech, S. M. The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8⁺ T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **41**, 802–814 (2014).

141. Mathieu, M., Cotta-Grand, N., Daudelin, J.-F., Thébault, P. & Labrecque, N. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 82–8 (2013).
142. Kao, C., Oestreich, K. J., Paley, M. A., Crawford, A., Angelosanto, J. M., Ali, M.-A. A., Intlekofer, A. M., Boss, J. M., Reiner, S. L., Weinmann, A. S. & Wherry, E. J. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nat. Immunol.* **12**, 663–71 (2011).
143. Lu, P., Youngblood, B. A., Austin, J. W., Mohammed, A. U. R., Butler, R., Ahmed, R. & Boss, J. M. Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection. *J. Exp. Med.* **211**, 515–27 (2014).
144. Youngblood, B., Oestreich, K. J., Ha, S.-J., Duraiswamy, J., Akondy, R. S., West, E. E., Wei, Z., Lu, P., Austin, J. W., Riley, J. L., Boss, J. M. & Ahmed, R. Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. *Immunity* **35**, 400–412 (2011).
145. Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D. M., Okumura, K., Azuma, M. & Yagita, H. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J. Immunol.* **169**, 5538–5545 (2002).
146. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity* **27**, 111–122 (2007).
147. Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* **8**, 239–245 (2007).
148. Liu, C., Jiang, J., Gao, L., Wang, X., Hu, X., Wu, M., Wu, J., Xu, T., Shi, Q. & Zhang, X. Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 340 (2015).
149. Zhao, J., Zhang, P., Wang, J., Xi, Q., Zhao, X., Ji, M. & Hu, G. Plasma levels of soluble programmed death ligand-1 may be associated with overall survival in nonsmall cell lung cancer patients receiving thoracic radiotherapy. *Medicine (Baltimore)*. **96**, e6102 (2017).
150. Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M. & Saito, T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–1217 (2012).
151. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* **173**, 945–54 (2004).
152. Sheppard, K.-A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R. & Chaudhary, D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3ζ signalosome and downstream signaling to PKCθ. *FEBS Lett.* **574**, 37–41 (2004).

153. Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L. & Boussiotis, V. A. Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci. Signal.* **5**, ra46-ra46 (2012).
154. Patsoukis, N., Li, L., Sari, D., Petkova, V. & Boussiotis, V. A. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3091–8 (2013).
155. Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M. J., Wallweber, H. A., Sasmal, D. K., Huang, J., Kim, J. M., Mellman, I. & Vale, R. D. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science (80-.)*. **355**, 1428–1433 (2017).
156. Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J. L., Brosnahan, K., Imam, S., Russell, K., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Dolfi, D., Angelosanto, J., Crawford, A., Shin, H., Kwon, D. S., Zupkosky, J., Francisco, L., Freeman, G. J., Wherry, E. J., Kaufmann, D. E., Walker, B. D., Ebert, B. & Haining, W. N. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* **16**, 1147–51 (2010).
157. Karwacz, K., Bricogne, C., MacDonald, D., Arce, F., Bennett, C. L., Collins, M. & Escors, D. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO Mol. Med.* **3**, 581–92 (2011).
158. Arasanz, H., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Ibañez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G., Escors, D., Arasanz, H., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Ibañez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G., Escors, D., Arasanz, H., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Ibañez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G. & Escors, D. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* **8**, 51936–51945 (2017).
159. Boussiotis, V. A. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1767–1778 (2016).
160. Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* **44**, 955–972 (2016).
161. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–51 (1999).
162. Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science (80-.)*. **291**, 319–322 (2001).
163. Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H. & Jones, R. G. Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function. *Science (80-.)*. **342**, 1242454 (2013).
164. O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J. & Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 553–565 (2016).
165. Parry-Billings, M., Calder, P. C., Newsholme, E. A. & Evans, J. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* **336**, 523–525 (1990).

166. Ron-Harel, N., Santos, D., Ghergurovich, J. M., Sage, P. T., Reddy, A., Lovitch, S. B., Dephoure, N., Satterstrom, F. K., Sheffer, M., Spinelli, J. B., Gygi, S., Rabinowitz, J. D., Sharpe, A. H. & Haigis, M. C. Mitochondrial Biogenesis and Proteome Remodeling Promote One-Carbon Metabolism for T Cell Activation. *Cell Metab.* **24**, 104–117 (2016).
167. Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., Wang, C.-R., Schumacker, P. T., Licht, J. D., Perlman, H., Bryce, P. J. & Chandel, N. S. Mitochondria Are Required for Antigen-Specific T Cell Activation through Reactive Oxygen Species Signaling. *Immunity* **38**, 225–236 (2013).
168. Peng, M., Yin, N., Chhangawala, S., Xu, K., Leslie, C. S. & Li, M. O. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science* (80-.). **354**, 481–484 (2016).
169. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *The Mitochondrion*. (Garland Science, 2002).
170. Kozjak-Pavlovic, V. The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res.* **367**, 83–93 (2017).
171. Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chausseot, A., Genin, E. C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D. G., Verschueren, A., Rouzier, C., Le Ber, I., Augé, G., Cochaud, C., Lespinasse, F., N'Guyen, K., de Septenville, A., Brice, A., Yu-Wai-Man, P., Sesaki, H., Pouget, J. & Paquis-Flucklinger, V. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain* **137**, 2329–45 (2014).
172. Darshi, M., Mendiola, V. L., Mackey, M. R., Murphy, A. N., Koller, A., Perkins, G. A., Ellisman, M. H. & Taylor, S. S. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* **286**, 2918–32 (2011).
173. Mehta, M. M., Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 608–620 (2017).
174. Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C.-H., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, G. J. W., Chen, Q., Huang, S. C.-C., O'Neill, C. M., Edelson, B. T., Pearce, E. J., Sesaki, H., Huber, T. B., Rambold, A. S. & Pearce, E. L. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* **166**, 63–76 (2016).
175. Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L. N., Karoly, E. D., Freeman, G. J., Petkova, V., Seth, P., Li, L. & Boussiotis, V. A. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 6692 (2015).
176. Chamoto, K., Chowdhury, P. S., Kumar, A., Sonomura, K., Matsuda, F., Fagarasan, S. & Honjo, T. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E761–E770 (2017).

177. Bengsch, B., Johnson, A. L., Kurachi, M., Odorizzi, P. M., Pauken, K. E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L. M., Paley, M. A., Delgoffe, G. M. & Wherry, E. J. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8⁺ T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–373 (2016).
178. Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., Ferris, R. L. & Delgoffe, G. M. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* **45**, 374–388 (2016).
179. Ajaz, S., Czajka, A. & Malik, A. Accurate Measurement of Circulating Mitochondrial DNA Content from Human Blood Samples Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol. Biol.* **1264**, 117–131 (2015).
180. Venegas, V. & Halberg, M. C. Measurement of mitochondrial DNA copy number. *Methods Mol. Biol.* **837**, 327–35 (2012).
181. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
182. Lee, H.-M., Sugino, H., Aoki, C., Shimaoka, Y., Suzuki, R., Ochi, K., Ochi, T. & Nishimoto, N. Abnormal networks of immune response-related molecules in bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R89 (2011).
183. You, S., Yoo, S.-A., Choi, S., Kim, J.-Y., Park, S.-J., Ji, J. D., Kim, T.-H., Kim, K.-J., Cho, C.-S., Hwang, D. & Kim, W.-U. Identification of key regulators for the migration and invasion of rheumatoid synoviocytes through a systems approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 550–5 (2014).
184. Ernst, J. & Bar-Joseph, Z. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinformatics* **7**, 191 (2006).
185. Andrews, N. C. & Faller, D. V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2499 (1991).
186. Acebo, P., Giner, D., Calvo, P., Blanco-Rivero, A., Ortega, A. D., Fernández, P. L., Roncador, G., Fernández-Malavé, E., Chamorro, M. & Cuezva, J. M. Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl. Oncol.* **2**, 138–45 (2009).
187. Dagda, R. K., Cherra, S. J., Kulich, S. M., Tandon, A., Park, D. & Chu, C. T. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* **284**, 13843–55 (2009).
188. Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V. & Amigorena, S. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* **38**, 336–348 (2013).
189. Soler Palacios, B., Estrada-Capetillo, L., Izquierdo, E., Criado, G., Nieto, C., Municio, C., González-Alvaro, I., Sánchez-Mateos, P., Pablos, J. L., Corbí, A. L. & Puig-Kröger, A. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J. Pathol.* **235**, 515–526 (2015).

190. McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429–442 (2007).
191. Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., Barnes, K. C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A. P., Aster, J. C., Sigaux, F., Soulier, J., Look, A. T., Young, R. A., Califano, A. & Ferrando, A. A. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18261–6 (2006).
192. Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N., Del Bianco, C., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Kung, A. L., Gilliland, D. G., Verdine, G. L. & Bradner, J. E. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* **462**, 182–8 (2009).
193. Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., Yankner, B. A. & Selkoe, D. J. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat. Cell Biol.* **2**, 463–5 (2000).
194. Pulikkan, J. A., Dengler, V., Peramangalam, P. S., Peer Zada, A. A., Muller-Tidow, C., Bohlander, S. K., Tenen, D. G. & Behre, G. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* **115**, 1768–1778 (2010).
195. Lee, J. S., Cella, M., McDonald, K. G., Garlanda, C., Kennedy, G. D., Nukaya, M., Mantovani, A., Kopan, R., Bradfield, C. A., Newberry, R. D. & Colonna, M. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat. Immunol.* **13**, 144–151 (2011).
196. Sunshine, J. C., Perica, K., Schneck, J. P. & Green, J. J. Particle shape dependence of CD8⁺ T cell activation by artificial antigen presenting cells. *Biomaterials* **35**, 269–277 (2014).
197. Perica, K., De León Medero, A., Durai, M., Chiu, Y. L., Bieler, J. G., Sibener, L., Niemöller, M., Assenmacher, M., Richter, A., Edidin, M., Oelke, M. & Schneck, J. Nanoscale artificial antigen presenting cells for T cell immunotherapy. *Nanomedicine* **10**, 119–29 (2014).
198. Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L. & Boussiotis, V. A. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci. Signal.* **5**, ra46 (2012).
199. Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* **275**, 251–5 (2003).
200. Shipkova, M. & Wieland, E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta* **413**, 1338–1349 (2012).
201. Green, J. A., Cooperband, S. R. & Kibrick, S. Immune Specific Induction of Interferon Production in Cultures of Human Blood Lymphocytes. *Science* (80-.). **164**, 1415–7. (1969).
202. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* **173**, 945–54 (2004).

203. Gracias, D. T., Stelekati, E., Hope, J. L., Boesteanu, A. C., Doering, T. A., Norton, J., Mueller, Y. M., Fraietta, J. A., Wherry, E. J., Turner, M. & Katsikis, P. D. The microRNA miR-155 controls CD8⁺ T cell responses by regulating interferon signaling. *Nat. Immunol.* **14**, 593–602 (2013).
204. Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N. & Šmuc, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**, e21800 (2011).
205. Barrell, D., Dimmer, E., Huntley, R. P., Binns, D., O'Donovan, C. & Apweiler, R. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **37**, D396–D403 (2009).
206. Genin, E. C., Plutino, M., Bannwarth, S., Villa, E., Cisneros-Barroso, E., Roy, M., Ortega-Vila, B., Fragaki, K., Lespinasse, F., Pinero-Martos, E., Augé, G., Moore, D., Burté, F., Lacas-Gervais, S., Kageyama, Y., Itoh, K., Yu-Wai-Man, P., Sesaki, H., Ricci, J.-E., Vives-Bauza, C. & Paquis-Flucklinger, V. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol. Med.* **8**, 58–72 (2016).
207. Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlir, P., Tomilin, N., Shupliakov, O., Lendahl, U. & Nistér, M. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J.* **30**, 2762–2778 (2011).
208. Aung, L. H. H., Li, R., Prabhakar, B. S. & Li, P. Knockdown of Mtfp1 can minimize doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting Dnm1l-mediated mitochondrial fission. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 3394–3404 (2017).
209. Monticone, M., Panfoli, I., Ravera, S., Puglisi, R., Jiang, M.-M., Morello, R., Candiani, S., Tonachini, L., Biticchi, R., Fabiano, A., Cancedda, R., Boitani, C. & Castagnola, P. The nuclear genes Mtf1 and Duf1 regulate mitochondrial dynamic and cellular respiration. *J. Cell. Physiol.* **225**, 767–76 (2010).
210. Tatsuta, T., Model, K. & Langer, T. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **16**, 248–59 (2005).
211. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. Evolution of the Molecular Machines for Protein Import into Mitochondria. *Science (80-.)*. **313**, 314–318 (2006).
212. Kinne, R. W., Stuhlmüller, B. & Burmester, G.-R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 224 (2007).
213. Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H. & Nakamura, T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R86 (2010).
214. Kim, S.-J., Chen, Z., Essani, A. B., Elshabrawy, H. A., Volin, M. V., Volkov, S., Swedler, W., Arami, S., Sweiss, N. & Shahrara, S. Identification of a Novel Toll-like Receptor 7 Endogenous Ligand in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid That Can Provoke Arthritic Joint Inflammation. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **68**, 1099–110 (2016).
215. Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., Margioris, A. N., Tsichlis, P. N. & Tsatsanis, C. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* **31**, 220–31 (2009).

216. Castro, J. E. Z., Vado-Solis, I., Perez-Osorio, C. & Fredeking, T. M. Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 370872 (2011).
217. Han, L., Su, W., Huang, J., Zhou, J., Qiu, S. & Liang, D. Doxycycline Inhibits Inflammation-Induced Lymphangiogenesis in Mouse Cornea by Multiple Mechanisms. *PLoS One* **9**, e108931 (2014).
218. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–69 (2008).
219. Schlaak, J. F., Pfers, I., Meyer Zum Büschenfelde, K. H. & Märker-Hermann, E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin. Exp. Rheumatol.* **14**, 155–62
220. Raza, K., Falciani, F., Curnow, S. J., Ross, E. J., Lee, C.-Y., Akbar, A. N., Lord, J. M., Gordon, C., Buckley, C. D. & Salmon, M. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R784 (2005).
221. Wang, J., Bai, X., Song, Q., Fan, F., Hu, Z., Cheng, G. & Zhang, Y. miR-223 Inhibits Lipid Deposition and Inflammation by Suppressing Toll-Like Receptor 4 Signaling in Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 24965–82 (2015).
222. Fischer, A. & Gessler, M. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4583–96 (2007).
223. Mann, C. D., Bastianpillai, C., Neal, C. P., Masood, M. M., Jones, D. J. L., Teichert, F., Singh, R., Karpova, E., Berry, D. P. & Manson, M. M. Notch3 and Hey-1 as Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma. *PLoS One* **7**, e51119 (2012).
224. Kumar, V., Palermo, R., Talora, C., Campese, A. F., Checquolo, S., Bellavia, D., Tottone, L., Testa, G., Miele, E., Indraccolo, S., Amadori, A., Ferretti, E., Gulino, A., Vacca, A. & Screpanti, I. Notch and NF- κ B signaling pathways regulate miR-223/FBXW7 axis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **28**, 2324–2335 (2014).
225. Gusscott, S., Kuchenbauer, F., Humphries, R. K. & Weng, A. P. Notch-mediated repression of miR-223 contributes to IGF1R regulation in T-ALL. *Leuk. Res.* **36**, 905–911 (2012).
226. Franco, C. B., Scripture-Adams, D. D., Proekt, I., Taghon, T., Weiss, A. H., Yui, M. A., Adams, S. L., Diamond, R. A. & Rothenberg, E. V. Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11993–8 (2006).
227. Shang, Y., Smith, S. & Hu, X. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein Cell* **7**, 159–74 (2016).
228. Gama-Norton, L., Ferrando, E., Ruiz-Herguido, C., Liu, Z., Guiu, J., Islam, A. B. M. M. K., Lee, S.-U., Yan, M., Guidos, C. J., López-Bigas, N., Maeda, T., Espinosa, L., Kopan, R. & Bigas, A. Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. **6**, 8510 (2015).

229. Van de Walle, I., Waegemans, E., De Medts, J., De Smet, G., De Smedt, M., Snauwaert, S., Vandekerckhove, B., Kerre, T., Leclercq, G., Plum, J., Gridley, T., Wang, T., Koch, U., Radtke, F. & Taghon, T. Specific Notch receptor–ligand interactions control human TCR- $\alpha\beta/\gamma\delta$ development by inducing differential Notch signal strength. *J. Exp. Med.* **210**, 683–97 (2013).
230. Petrovic, J., Formosa-Jordan, P., Luna-Escalante, J. C., Abelló, G., Ibañes, M., Neves, J. & Giraldez, F. Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Development* **141**, 2313–24 (2014).
231. Taylor, S. E. B., Li, Y. H., Wong, W. H. & Bhutani, N. Genome-wide mapping of DNA hydroxymethylation in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **67**, 2129–40 (2015).
232. Kuang, S.-Q., Fang, Z., Zweidler-McKay, P. A., Yang, H., Wei, Y., Gonzalez-Cervantes, E. A., Boumber, Y. & Garcia-Manero, G. Epigenetic Inactivation of Notch-Hes Pathway in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* **8**, e61807 (2013).
233. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–862 (1993).
234. Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* **206**, 2027–2035 (2009).
235. Sekine, H., Mimura, J., Oshima, M., Okawa, H., Kanno, J., Igarashi, K., Gonzalez, F. J., Ikuta, T., Kawajiri, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Hypersensitivity of Aryl Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice to Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 6391–6400 (2009).
236. Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A. & Stockinger, B. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 43–9 (2009).
237. Vogel, C. F. A., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G. & Matsumura, F. RelB, a New Partner of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2941–2955 (2007).
238. Quintana, F. J. & Sherr, D. H. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol. Rev.* **65**, 1148–61 (2013).
239. Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug, A. & Rannug, U. The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J. Biol. Chem.* **284**, 2690–6 (2009).
240. Hooper, L. V., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Stockinger, B., Oukka, M., Weiner, H. L., Yarovinsky, F. & Hooper, L. V. You AhR what you eat: linking diet and immunity. *Cell* **147**, 489–91 (2011).
241. Huang, B., Butler, R., Miao, Y., Dai, Y., Wu, W., Su, W., Fujii-Kuriyama, Y., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Dysregulation of Notch and ER α signaling in AhR-/- male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 11883–11888 (2016).

242. Lee, J. S., Cella, M., McDonald, K. G., Garlanda, C., Kennedy, G. D., Nukaya, M., Mantovani, A., Kopan, R., Bradfield, C. A., Newberry, R. D. & Colonna, M. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat. Immunol.* **13**, 144–151 (2011).
243. Leipe, J., Grunke, M., Dechant, C., Reindl, C., Kerzendorf, U., Schulze-Koops, H. & Skapenko, A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 2876–2885 (2010).
244. Geng, Q., Fan, T., Zhang, B., Wang, W., Xu, Y. & Hu, H. Five microRNAs in plasma as novel biomarkers for screening of early-stage non-small cell lung cancer. *Respir. Res.* **15**, 149 (2014).
245. Herberth, G., Bauer, M., Gasch, M., Hinz, D., Röder, S., Olek, S., Kohajda, T., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., Sack, U., Borte, M., Lehmann, I. & Lifestyle and Environmental Factors and Their Influence on Newborns Allergy Risk study group. Maternal and cord blood miR-223 expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 543–550.e4 (2014).
246. Okazaki, T. & Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* **19**, 813–824 (2007).
247. Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J. L., Brosnahan, K., Imam, S., Russell, K., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Dolfi, D., Angelosanto, J., Crawford, A., Shin, H., Kwon, D. S., Zupkosky, J., Francisco, L., Freeman, G. J., Wherry, E. J., Kaufmann, D. E., Walker, B. D., Ebert, B. & Haining, W. N. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8⁺ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* **16**, 1147–1151 (2010).
248. Zhang, G., Li, N., Li, Z., Zhu, Q., Li, F., Yang, C., Han, Q., Lv, Y., Zhou, Z. & Liu, Z. microRNA-4717 differentially interacts with its polymorphic target in the PD1 3' untranslated region: A mechanism for regulating PD-1 expression and function in HBV-associated liver diseases. *Oncotarget* **6**, 4–6 (2015).
249. Grenda, A. & Krawczyk, P. New Dancing Couple: PD-L1 and MicroRNA. *Scand. J. Immunol.* **86**, 130–134 (2017).
250. Iliopoulos, D., Kavousanaki, M., Ioannou, M., Boumpas, D. & Verginis, P. The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1754–1763 (2011).
251. Ifergan, I., Chen, S., Zhang, B. & Miller, S. D. Cutting Edge: MicroRNA-223 Regulates Myeloid Dendritic Cell-Driven Th17 Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **196**, 1455–1459 (2016).
252. Kamburov, A., Pentchev, K., Galicka, H., Wierling, C., Lehrach, H. & Herwig, R. ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. *Nucleic Acids Res.* **39**, D712–7 (2011).
253. Ramsay, A. G., Johnson, A. J., Lee, A. M., Gorgün, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J. C. & Gribben, J. G. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J. Clin. Invest.* **118**, 2427–37 (2008).

254. Ghoneim, H. E., Fan, Y., Moustaki, A., Abdelsamed, H. A., Dash, P., Dogra, P., Carter, R., Awad, W., Neale, G., Thomas, P. G. & Youngblood, B. De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* **170**, 142–157.e19 (2017).
255. Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., Ferris, R. L. & Delgoffe, G. M. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* **45**, 374–388 (2016).
256. Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L. C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A. & Scorrano, L. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* **155**, 160–71 (2013).
257. Li, H., Ruan, Y., Zhang, K., Jian, F., Hu, C., Miao, L., Gong, L., Sun, L., Zhang, X., Chen, S., Chen, H., Liu, D. & Song, Z. Mic60/Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ.* **23**, 380–392 (2016).
258. Genin, E. C., Plutino, M., Bannwarth, S., Villa, E., Cisneros-Barroso, E., Roy, M., Ortega-Vila, B., Fragaki, K., Lespinasse, F., Pinero-Martos, E., Auge, G., Moore, D., Burte, F., Lacas-Gervais, S., Kageyama, Y., Itoh, K., Yu-Wai-Man, P., Sesaki, H., Ricci, J.-E., Vives-Bauza, C. & Paquis-Flucklinger, V. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol. Med.* **8**, 58–72 (2016).
259. Darshi, M., Mendiola, V. L., Mackey, M. R., Murphy, A. N., Koller, A., Perkins, G. A., Ellisman, M. H. & Taylor, S. S. ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function. *J. Biol. Chem.* **286**, 2918–2932 (2011).
260. Bengsch, B., Johnson, A. L., Kurachi, M., Odorizzi, P. M., Pauken, K. E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L. M., Paley, M. A., Delgoffe, G. M. & Wherry, E. J. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–73 (2016).

AGRADECIMIENTOS

Para llegar hasta este punto he de agradecer todo lo que estos cuatro años me han dado.

En primer lugar, a mis directores de tesis, Santos Mañes y Rosa Ana Lacalle. Son ejemplos a seguir por su rigurosidad y su espíritu incansable, e intentaré acercarme a sus niveles. Gracias a ellos creo que he podido crecer como científico, y además me han ayudado a conocerme mejor como persona.

Han sido muy importantes para mí todos los compañeros que he conocido, gracias a los cuales he sentido el CNB como mi propia casa. A todos mis compañeros de laboratorio que siempre me han ayudado: Manu, Lorena, Ana, Javi, Diego, Emilia, Rosa, Laura, Raquel, Gabi, Tania, Álvaro... Y a todos mis compañeros del CNB.

Si he podido hacer todos los experimentos es también porque el CNB cuenta con muchos servicios que nos apoyan cada día de trabajo. “Cocinas”, citometría de flujo, microscopía electrónica y confocal, bioinformática, genómica...son fundamentales para nosotros.

También agradecer a quien ha hecho posible este proyecto económicamente, el ministerio de Economía y Competitividad.

Todo lo que ha rodeado mi estancia en el CNB lo ha hecho muy especial. Ser parte de la representación *Junior* de los predoctorales del DIO, organizar una parte del DIO *retreat*, participar en proyectos de emprendimiento con Carlos García Briz, y también en *cryptos* junto a Vallejo, impulsar al Triatlón Cantoblanco... son cosas que no voy a olvidar nunca.

En el plano personal estos cuatro años habrían sido muy diferentes sin Sonia a mi lado, muchas gracias por tu comprensión y por hacerme inmensamente feliz. Parte de esto también es tuyo. Y agradecer a su familia por acogerme como si de un hijo más me tratara.

A mi propia familia agradecerle que siempre han respetado mis decisiones y han permitido dirigir mi vida y estudios hacia donde he creído mejor para mí. Gracias a ellos he podido estudiar y dedicarme a lo que hasta ahora me llena el corazón. Si soy como soy es por ellos, porque su forma de ser me acompaña. Espero que en un futuro cercano puedan enorgullecerse, y poder devolverles todo lo que han depositado en mí.

Tras esta etapa vendrán otras, espero poder seguir ligado a la ciencia de una forma o de otra, solo deseo que sea tan apasionante como esta etapa predoctoral.